

**Synthese
und ENDOR-Untersuchung
von Radikalen
des Flavin-Systems**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Bock
aus Berlin

1984





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546612_0025

Synthese
und ENDOR-Untersuchung
von Radikalen
des Flavin-Systems

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Bock

aus Berlin

Gutachter: Prof. Dr. H. Kurreck
Prof. Dr. W. Broser

Tag der mündlichen Prüfung:

01. MRZ. 1984

Wir müssen wissenschaftlich vorgehen. Wir dürfen uns nicht von Meinungen bestimmen lassen, sondern von logischen Schlüssen. Wir müssen versuchen, das Vernünftige zu finden. Wir dürfen uns keinen Denkfehler leisten, weil ein Fehlschluß zur Katastrophe führen müßte.

F. Dürrenmatt, Die Physiker

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden teilweise bereits publiziert:

1. M. Bock, W. Lubitz, and H. Kurreck,
J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 5567
2. H. Kurreck, M. Bock, N. Bretz, M. Elsner, H. Kraus, W.
Lubitz, F. Müller, J. Geissler, P. M. H. Kroneck,
J. Am. Chem. Soc. in press
3. H. Kurreck, M. Bock, W. Lubitz,
Rocky Mountain Conference, Denver, Colorado, 1981
4. M. Bock, H. Kurreck, W. Lubitz,
Tagung der Gesellschaft deutscher Chemiker, Fachgruppe
Magnetische Resonanzspektroskopie, Bad Nauheim, 1981
5. H. Kurreck (Hauptvortrag),
Gordon Research Conference "Radical Ions", Wolfboro, USA,
1982
6. M. Bock, H. Kurreck, M. Elsner,
Tagung der Gesellschaft deutscher Chemiker, Fachgruppe
Magnetische Resonanzspektroskopie, Günzburg, 1982
7. H. Kurreck (Hauptvortrag),
Tagung der Gesellschaft deutscher Chemiker, Fachgruppe
Magnetische Resonanzspektroskopie, Bornheim, 1983

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung.....	8
2. Allgemeiner Teil.....	15
2.1. Grundlagen der EPR-Spektroskopie.....	15
2.2. Grundlagen der ENDOR-Spektroskopie...	18
2.3. Grundlagen der TRIPLE-Spektroskopie..	24
2.4. ENDOR-induced EPR (EIE).....	26
2.5. ENDOR in gefrorenen Lösungen.....	27
2.6. Spindichte-Transfer-Mechanismen.....	32
2.6.1. α -Protonen.....	32
2.6.2. β -Protonen.....	33
2.6.3. γ -Protonen.....	34
2.7. Elektrochemische Erzeugung von Radikalen.....	35
3. Spezieller Teil.....	37
3.1. Namen und Strukturen der untersuchten und dargestellten Verbindungen.....	37
3.2. Synthesen der Verbindungen.....	45
3.2.1. Alloxazine und Isoalloxazine.....	45
3.2.2. Thiaalloxazine und Thiaisoalloxazine.	46
3.2.3. Radikalerzeugungsmethoden.....	48
3.2.3.1. Alloxazin- und Isoalloxazin-Radikale.	48
3.2.3.2. Thiaalloxazin- und Thiaisoalloxazin- Radikale.....	49
3.3. Spektroskopische Untersuchung der Verbindungen.....	50
3.3.1. NMR-Spektren.....	50
3.3.2. Massenspektren.....	57
3.3.3. EPR- und ENDOR-Spektren.....	67
3.3.3.1. Isotrope flüssige Lösungen.....	68
Radikale der Grundkörper.....	68

	Seite
Alloxazin-Radikale.....	75
Isoalloxazin-Radikale.....	79
Thiaalloxazin-Radikale.....	101
Thiaisoalloxazin-Radikale.....	104
3.3.3.2. Messungen an gefrorenen Lösungen.....	117
Enzyme.....	130
4. Diskussion der Meßergebnisse.....	137
4.1. Radikale im Flavin-System.....	137
4.2. Ergebnisse der Messungen an flüssigen Lösungen.....	144
4.2.1. Radikale der Grundkörper.....	144
4.2.2. Alloxazin- und Isoalloxazin-Radikale. Kationradikale.....	148
Neutralradikale.....	155
Anionradikale.....	157
Radikale in wäßrigen Lösungen.....	160
4.2.3. Thiaalloxazin- und Thiaisoalloxazin- Radikale.....	161
4.3. Ergebnisse der Messungen an gefrorenen Lösungen.....	166
4.3.1. Flavin- und Thiaflavin-Radikale.....	166
4.3.2. Radikale der Enzyme.....	175
5. Experimenteller Teil.....	180
5.1. Instrumentation.....	180
5.1.1. Massenspektrometer.....	180
5.1.2. NMR-Spektrometer.....	180
5.1.3. EPR- und ENDOR-Spektrometer.....	180
5.1.4. Computersimulation.....	182
5.2. Radikalerzeugung.....	183
5.2.1. Alloxazin- und Isoalloxazin-Radikale. Kationradikale.....	184
Neutralradikale.....	185

	Seite
	Anionradikale..... 185
5.2.2.	Flavoenzymradikale..... 187
	NADPH-Dehydrogenase..... 187
	Flavodoxine..... 188
	Methanol-Oxidase..... 188
5.2.3.	Thiaalloxazin- und Thiaisoalloxazin- Radikale..... 188
	Kationradikale..... 188
	Neutralradikale..... 189
5.3.	Darstellung der Substanzen..... 189
6.	Zusammenfassung..... 195
7.	Ausblick..... 200
8.	Anhang..... 201
8.1.	Verwendete Symbole und Konstanten.... 201
8.2.	Abkürzungen..... 202
8.3.	Maßsystem..... 203
9.	Literaturverzeichnis..... 204

1. Einleitung und Problemstellung

In der letzten Zeit sind viele Elementarvorgänge durch die Naturwissenschaften ausgiebig untersucht und beschrieben worden. Es ist nun möglich geworden, die bereits gewonnenen Kenntnisse und entwickelten Untersuchungsmethoden auf komplexere Probleme anzuwenden, so daß endlich der ewige Wunsch der Wissenschaftler erfüllt werden kann, ein Verständnis biologischer und biochemischer Prozesse zu erlangen. Auf dem Weg dahin müssen allerdings zahlreiche Versuche an kleinen Modellverbindungen bis hin zu größeren biologisch interessanten Molekülen durchgeführt werden, ehe daran gedacht werden kann, ganze Reaktionskomplexe oder sogar Zellorganellen mit einer Meßmethode zu untersuchen.

Die magnetische Resonanzspektroskopie hat, nachdem sie an anorganischen und organischen Substanzen getestet und optimiert wurde, eine große Bedeutung in den Biowissenschaften und in der Medizin gewonnen /1/. Die Kernresonanzspektroskopie (NMR) wird inzwischen sogar schon bei der Untersuchung am lebenden Menschen als NMR-Tomografie /2-4/ eingesetzt. Die paramagnetische Elektronenresonanz EPR und im besonderen die Elektron-Kern-Doppel-Resonanz ENDOR sind in einem Entwicklungsstadium, das ihren Einsatz bei Experimenten an biologisch relevanten Molekülen (z. B. Vitamine und Coenzyme) über Enzyme bis hin zu intakten Reaktionszentren aus Membranen /5/ zuläßt.

Ein Einsatzfeld dieser Untersuchungsmethoden sind Vorgänge, die durch Elektronenübertragungen zur Energiegewinnung beitragen. Biochemische Redoxprozesse ermöglichen beispielsweise den Transfer von Elektronen aus einem Substrat, das der Nahrung entnommen wurde und als energiereiches Abbauprodukt vorliegt, auf molekularen Sauerstoff über mehrere zwischengeschaltete Stufen. Aus dieser exergonen Reaktion gehen unter anderem energiereiche Moleküle wie z. B. Adenosin-Triphosphat (ATP) als "Energiespeicher" hervor. Dieser in mehrere Teilschritte zerlegte Elektronentransfer findet in den inneren Membranen der Mitochondrien statt und wird Atmungskette ge-

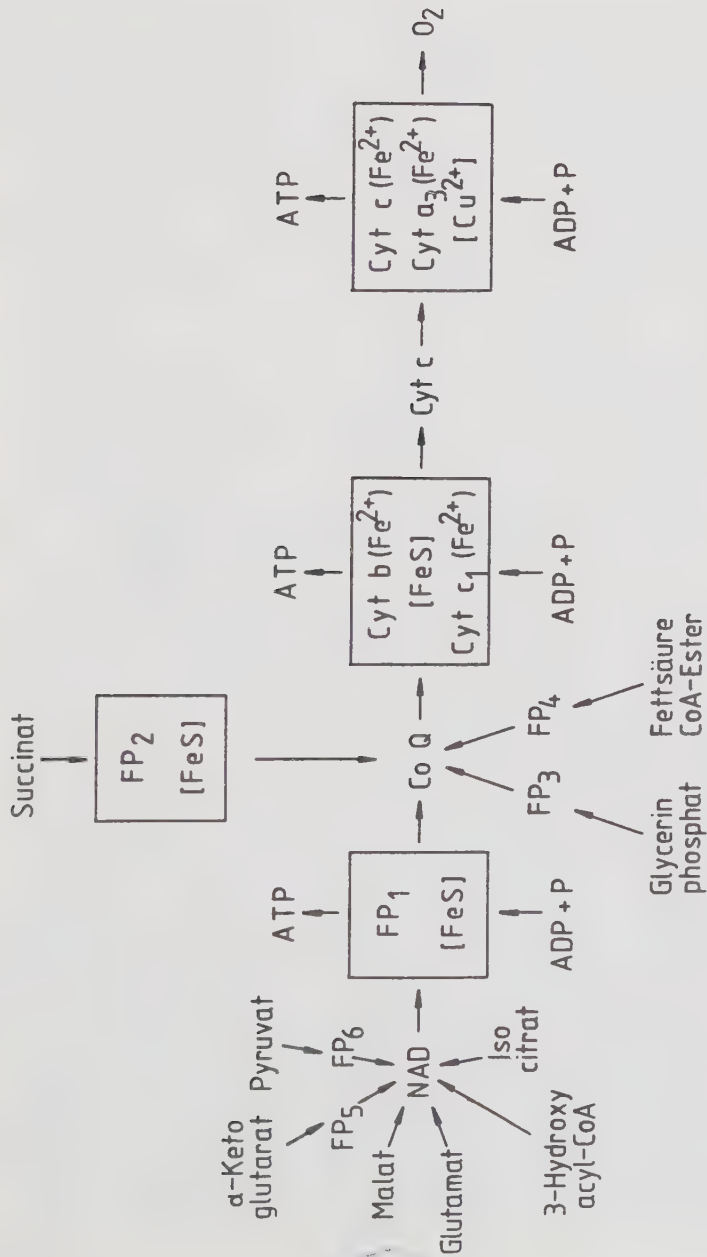


Abbildung 1. Atmungskette in Säugetiermitochondrien. Eingerahmt sind Enzymkomplexe.

FP = Flavoprotein, NAD = Nicotinamidprotein, Co Q = Ubichinon, Cyt = Cytochrom,

[FeS] = Eisen-Schwefel-Zentrum

nannt (s. Abb. 1). Durch die an ihn gekoppelte Bildung von ATP (Phosphorylierung) ist die Aufrechterhaltung des Energiehaushalts in den Zellen gewährleistet /6-8/. Innerhalb dieser Kette von Redoxsystemen spielen die Flavoenzyme (Flavoproteine) eine bedeutende Rolle /9-14/, da über sie Elektronen aus anderen Prozessen in die Atmungsketten-Phosphorylierung eingebracht werden. Sie können sowohl ein als auch zwei Elektronen von einem Donator- auf ein Akzeptor-Molekül übertragen und damit Ein-Elektron- und Zwei-Elektronen-Prozesse miteinander koppeln.

Eine Klasse der Flavoenzyme sind die Dehydrogenasen, die durch molekularen Sauerstoff nicht oxidiert werden können. Vertreter dieser Enzymunterklasse sind die NADH-Dehydrogenase und die Succinat-Dehydrogenase. Oxidasen dagegen können mit Sauerstoff direkt reagieren. Zu ihnen gehören die Aminosäure-Oxidase und die Xanthin-Oxidase. Weiterhin kennt man die Gruppe der Elektronen-Transferasen, die nur ein Elektron übertragen. Flavodoxine sind reine Elektronen-Transferasen. Als prosthetische Gruppen der Flavoproteine dienen Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD), Flavin-Mononucleotid (FMN) und manchmal auch Riboflavin (Vitamin B₂), die sowohl kovalent (Succinat-Dehydrogenase) als auch nicht kovalent an die Proteinkette gebunden sein können.

Den redoxaktiven Teil der Coenzyme bildet das Isoalloxazin-System, das im Unterschied zu den Alloxazinen in Position 10 einen Substituenten trägt. Damit Untersuchungsmethoden wie die magnetische Resonanzspektroskopie auf komplizierte Enzymsysteme angewendet werden können, müssen zuerst die optimalen Meßbedingungen an einfacheren Modellmolekülen herausgefunden werden. Diese Grundmoleküle sollten im Rahmen des Experimentes noch ähnliche Eigenschaften haben wie das Enzym oder das Coenzym. Im Falle der Flavoenzyme hat sich das Lumiflavin als Modell bewährt (Abb. 2) /15/. Lumichrom als nächst kleineres Molekül hat hingegen ein wichtiges Strukturmerkmal der Flavine verloren, nämlich einen Substituenten in Position 10. Es liegt in der tautomeren Form eines Alloxazins vor und besitzt deswegen auch andere Eigenschaften /16/.

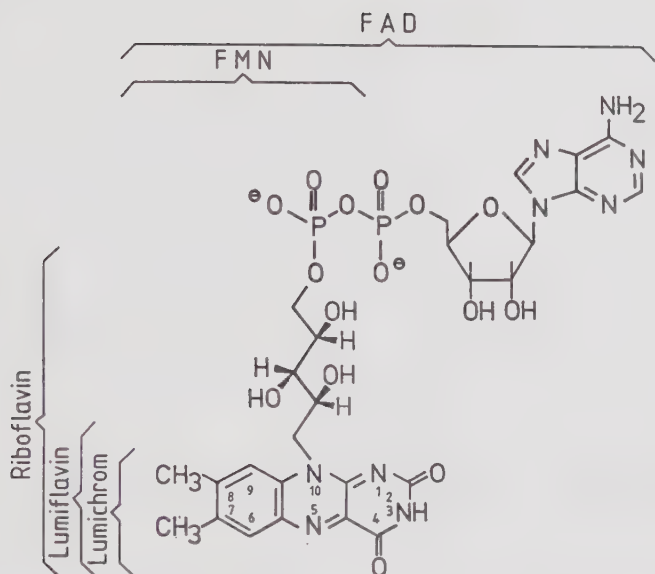


Abbildung 2. Flavin-Adenin-Dinucleotid und seine Untereinheiten

Bei der Aufnahme zweier Elektronen von einem Donator wechselt das Flavin vom oxidierten zu einem diamagnetischen reduzierten Zustand /17/. Mit Hilfe der NMR-Spektroskopie wurde diese Reaktion bereits ausgiebig untersucht /18/. Wird allerdings nur ein Elektron transferiert, so entsteht als reaktive Zwischenstufe eine paramagnetische Spezies, ein Radikal /19-21/. Sogar in Enzymen konnte diese durch die EPR-Spektroskopie nachgewiesen werden /22-25/. Allerdings kann man detailliertere Erkenntnisse über das Radikal im Enzym aus dem EPR-Spektrum nicht erhalten, da infolge des großen Molekülvolumens eines Proteins (Molekulargewicht 10 000 - 1 000 000) und der großen Hyperfein-Anisotropie einiger Stickstoffatome im Flavin-kern die optimale Rotations-Korrelations-Zeit für ein gut aufgelöstes Spektrum bei Raumtemperatur nicht erreicht wird. Somit werden Dipol-Dipol-Wechselwirkungen und anisotrope Beiträge nicht ausgemittelt. Man erhält deshalb selbst von einem

Modell, dem Lumiflavin-Radikal, nur ein EPR-Spektrum der flüssigen Radikallösung mit relativ breiten und unaufgelösten Linien, die höchstens durch ein entsprechendes Computerprogramm analysiert werden können /26/.

Will man detailliertere Auskunft über Spindichte-Verteilung und Struktur dieser Verbindungen bekommen, so muß zu einer Weiterentwicklung der EPR-Spektroskopie gegriffen werden. Die Doppelresonanzmethode ENDOR /27/ und die Dreifachresonanz-Spektroskopie TRIPLE /28,29/ ermöglichen eine weitaus bessere Auflösung und liefern deshalb mehr Information über untersuchte Radikale. Erkauft wird dieser Datengewinn durch einen komplizierten apparativen Aufbau und schwierig einzustellende Meßbedingungen, die erst durch Variation vieler Größen wie Temperatur, Radikalkonzentration, Lösungsmittel und Feldstärken optimiert werden müssen.

Nachdem die ersten EPR-Spektren der verschiedensten Flavin-Radikalspezies bekannt /30-40/ und auch einige wenige ENDOR-Spektren von Flavin- und Flavoenzym-Radikalen veröffentlicht waren /41-49/, trat eine lange Pause ein, in der kaum neue Erkenntnisse gewonnen werden konnten. Erst durch den Aufbau von ENDOR-Spektrometern mit entsprechenden Resonatoren, die höhere RF-Felder ermöglichen /50/, gelingt es nun, hochaufgelöste ENDOR-Spektren auch in flüssigen Lösungen zu erhalten /51,52/.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Mehrfachresonanzmethoden ENDOR und TRIPLE auf Flavine und ihre Modellsubstanzen angewendet werden. Dazu müssen zunächst geeignete Radikalerzeugungsmethoden für langlebige Kation-, Neutral- und Anionradikale gefunden werden. Nach Optimierung der ENDOR-Bedingungen für Messungen in isotropen flüssigen Lösungen können dann die ENDOR- und TRIPLE-Spektren der verschieden protonierten Typen von Flavinradikalen aufgenommen werden. Es sollten die Resonanzlinien der magnetisch aktiven Kerne ^1H , ^2H , ^{14}N , ^{15}N und ^{13}C meßbar sein.

Die gewonnenen Hyperfeinwechselwirkungskonstanten (HFSCs) geben Aufschluß über die Spindichteverteilung im Radikal. Leider spiegeln die Intensitäten der ENDOR-Resonanzlinien

nicht die Anzahl der Kerne wider, die für diese Absorptionen verantwortlich sind. Es ist deswegen notwendig, durch selektive Deuterierung eine Zuordnung von HFSCs zu Molekülpositionen zu treffen. Infolge des wesentlich kleineren gyromagnetischen Verhältnisses von Deuterium- gegenüber Wasserstoffkernen werden die entsprechenden Resonanzlinien zu tieferen Frequenzen verschoben. Für die Positionen, die schwer zu deuterieren sind, kann Methylsubstitution in Verbindung mit der Messung der relativen Vorzeichen der Kopplungskonstanten mit General-TRIPLE die Zuordnung ermöglichen. Wenn ein Proton im Radikal durch eine Methylgruppe ersetzt wird, sollte dies zumindest bei großen HFSCs zu einer Umkehr des Vorzeichens führen, da aufgrund theoretischer Überlegungen andere Spindichte-Transfer-Mechanismen bei α -Protonen und β -Protonen wirksam sind.

In isotroper flüssiger Lösung von Modellradikalen werden die anisotropen Größen infolge der Brownschen Molekularbewegung weitgehend ausgemittelt. Will man genauere Erkenntnisse über räumliche Strukturen der Radikale und ihre Umgebung bekommen, so muß die Bewegung der Moleküle stark eingeschränkt werden. Die geordnetsten Verhältnisse findet man in Einkristallen. Allerdings ist es schwierig, diese mit paramagnetischen Flavinzentren zu erzeugen. Weiterhin erfordert die spektroskopische Untersuchung von Einkristallen mit ENDOR eine spezielle Apparatur und einen hohen Zeitaufwand, um zu entsprechenden Ergebnissen zu kommen, da die Winkelabhängigkeiten der HFSCs für Drehungen des Systems um mehrere Achsen gemessen werden müssen. Einfacher ist es, an gefrorenen Lösungen der Radikale zu spektroskopieren. Hier sind die paramagnetischen Moleküle statistisch regellos in einer Matrix angeordnet /53/. Man kann unter günstigen Bedingungen aus einem derartigen ENDOR-Spektrum sämtliche HFS-Komponenten erhalten und diese durch geeignete Selektion der zu entsättigenden EPR-Komponente den verschiedenen Orientierungen zuordnen. Die ENDOR-Messungen im Rahmen dieser Arbeit sollten auch hier Fortschritte gegenüber bekannten Spektren ergeben /41-49/.

Nach der Untersuchung von Modellsubstanzen ist es erstrebenswert, auch ENDOR-Spektren von Enzymen in wäßrigem Milieu zu

erhalten. Bisher ist erst ein erfolgreiches ENDOR-in-Lösung-Experiment an einem biologischen Molekül mit großem Molekulargewicht bekannt, und zwar gelang in der Gruppe von Professor Möbius die Untersuchung von Reaktionszentren der Photosynthese in flüssiger wäßriger Lösung /5/. Aufgrund der Molekülgröße der Flavoenzyme sind allerdings für ENDOR-in-Lösung andere Bedingungen erforderlich, als es Wasser als Lösungsmittel und das Protein zulassen. Somit sollte es kaum möglich sein, ENDOR-Spektren von Flavoenzymen in wäßrigen flüssigen Lösungen zu erhalten. In gefrorenen Lösungen spielen diese Größen keine Rolle mehr. Da auch die starke Dämpfung der Mikrowelle durch Wasser im gefrorenen Zustand wegfällt, sollte die Aufnahme der ENDOR-Spektren von gefrorenen Enzymradikal-Lösungen möglich sein. Man erhält dann wieder alle HFS-Komponenten für die verschiedenen Orientierungen der Radikale. Der Vergleich dieser Werte mit denen der entsprechenden isolierten Coenzyme kann Aussagen über den Protonierungszustand der Coenzyme und ihre Bindung zur Proteinhülle zulassen.

Ein weiteres interessantes Feld für ENDOR ist die Untersuchung von flavinanalogen Radikalen. Hierzu gehören Moleküle mit anderen Substituenten, die eine Bindung zum Protein /43, 54-56/ oder natürliche große Reste simulieren können, und Flavine, bei denen Atome im Ringsystem gegen Schwefel /57-59/ oder andere Kerne /60-63/ ausgetauscht wurden. Auch hier sind wieder die schon genannten Meß- und Zuordnungsmethoden anzuwenden. Der Vergleich der ENDOR-Ergebnisse von diesen Radikalen mit denen der Flavin-Radikale zeigt dann die unterschiedlichen Eigenschaften dieser Systeme auf.

Somit sind für diese Arbeit folgende Aufgaben gestellt:

1. Synthese von deuterierten und methylsubstituierten Flavinen und Flavinanalogen
2. Charakterisierung dieser Verbindungen
3. Darstellung aller möglichen protonierten Formen der Radikale
4. Messung aller Hyperfeinkopplungskonstanten für die Kerne ^1H , ^2H , ^{14}N , ^{15}N und ^{13}C in flüssiger Lösung
5. Messung der HFS-Komponenten in gefrorenen Lösungen
6. Aufnahme der ENDOR-Spektren einiger Flavoenzym-Radikale

2. Allgemeiner Teil

Obwohl es umfangreiche Literatur über die Theorie der EPR-/64,65/ und ENDOR-Spektroskopie /27,66/ gibt, soll an dieser Stelle trotzdem eine kurze Zusammenfassung der theoretischen Grundlagen der EPR- und besonders der Mehrfachresonanz-Spektroskopien ENDOR und TRIPLE gegeben werden, wobei auch auf Messungen in anisotropen Medien eingegangen wird.

2.1. Grundlagen der EPR-Spektroskopie

Die Elektronen-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) oder "Electron paramagnetic resonance"-Spektroskopie (EPR) eignet sich zum Nachweis von Molekülen mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen, den Radikalen, die durch ihren Paramagnetismus ausgezeichnet sind.

Die EPR-Absorptionssignale resultieren aus hochfrequent (9 GHz, Mikrowellen) induzierten Übergängen zwischen den Elektron-Zeeman-Energieniveaus, die verschiedenen Orientierungen des Elektronenspins M_s in einem äußeren statischen Magnetfeld entsprechen (s. Abb. 3a). Die Resonanzbedingung für einen Spin-Übergang ($\Delta M_s = 1$) ist

$$E = h\nu = g \mu_B B_0 \quad (1)$$

mit g = elektronischer g-Faktor (freies Elektron $g = 2,0023$ /67/)

μ_B = Bohrsches Magneton

B_0 = äußeres statisches Magnetfeld

In einem organischen Radikal erfährt das ungepaarte Elektron aber außerdem Wechselwirkungen mit den magnetischen Momenten der im Molekülgerüst befindlichen magnetisch aktiven Kerne. Infolge der Hyperfeinkopplung ergeben sich statt eines Übergangssignals mehrere Linien (Abb. 3 c, d). Weiterhin ist die Spin-Bahn-Kopplung des Elektrons Ursache für eine Verschiebung des Spektrenzentrums gegenüber dem Signal eines freien Elektrons.

Das EPR-Spektrum gibt also alle in der makroskopischen Probe möglichen Kombinationen der Wechselwirkungen des Elektrons mit Kernen in Form eines Viellinienspektrums wieder

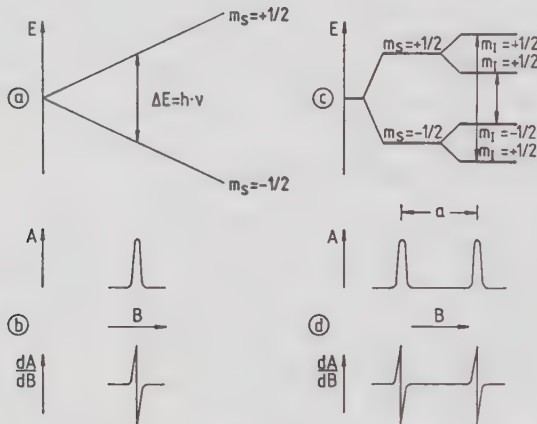


Abbildung 3. a) Energetische Aufspaltung der Spinzustände eines ungepaarten Elektrons in einem äußeren statischen Magnetfeld B
 b) Absorptionssignal für den EPR-Übergang sowie erste Ableitung des Signals
 c) Energetische Aufspaltung der Spinzustände in einem Spinsystem $M_S = 1/2$, $M_I = 1/2$
 d) Absorptionssignale für die EPR-Übergänge des Spinsystems $M_S = 1/2$, $M_I = 1/2$ sowie erste Ableitung der Signale

Die verschiedenen Energie-Eigenwerte und damit bei Kenntnis der Auswahlregeln die möglichen Übergänge zwischen ihnen ergeben sich aus dem Spin-Hamilton-Operator eines Dublettradikals unter Berücksichtigung sämtlicher Wechselwirkungen (Hochfeldnäherung):

$$\hat{H} = \mu_B \hat{g} \hat{B}_0 \hat{S} - g_K \mu_K \hat{I} \hat{B}_0 + a \hat{S} \hat{I} + \hat{S} \hat{A} \hat{I} + \hat{I} \hat{Q} \hat{I} \quad (2)$$

1
2
3
4
5

mit den Termen 1 = Elektron-Zeeman-Term

2 = Kern-Zeeman-Term

3 = isotroper Hyperfeinwechselwirkungsterm

4 = anisotroper Hyperfeinwechselwirkungsterm

5 = Quadrupolterm

$$E = g \mu_B B_0 M_S - g_K \mu_K B_0 M_I + a M_S M_I + A' M_S M_I + Q' (M_I^2 - 1/3 I(I+1)) \quad (3)$$

$$\Delta E = h\nu = g \mu_B B_0 + a M_I + A' M_I \quad (4)$$

In isotropen flüssigen Lösungen werden gerichtete (anisotrope) Wechselwirkungen durch die Brownsche Molekularbewegung ausgemittelt. Der anisotrope HFS-Term (Term 4) in den Gleichungen trägt nur bei Messungen von beschränkt beweglichen Radikalen in flüssigen Kristallen, gefrorenen Lösungen, Pulvern oder Einkristallen zum EPR-Spektrum bei. Aus Gleichung 4 ist zu erkennen, daß der Quadrupol-Term die EPR-Signale in erster Ordnung nicht beeinflußt.

Somit lassen sich einem EPR-Spektrum folgende Daten entnehmen:

a. der g-Faktor

Die g-Faktoren organischer Dublettradikale unterscheiden sich nur unwesentlich von dem des freien Elektrons. Die Abweichungen sind proportional zur Spindichte an Heteroatomen des Radikals sowie zu deren Spin-Bahn-Kopplungskonstanten, was sich aber erst für Kerne mit höheren Massen bemerkbar macht. Da der g-Faktor ein Tensor ist, können sich in anisotropen Lösungen für die drei Hauptachsen eines Koordinatensystems verschiedene Werte für ein Radikal ergeben.

b. die isotrope Hyperfeinwechselwirkungskonstante a

Sie ergibt sich direkt aus dem EPR-Spektrum in isotroper flüssiger Lösung oder durch Mittelung der anisotropen HFS-Komponenten. Nach Anwendung des Hamilton-Operators für die Kontaktwechselwirkung eines Elektrons mit einem Kern kann man eine Proportionalität zwischen der HFSC und der

Spindichte $\rho(r_K)$ am Kernort errechnen:

$$a = \frac{2}{3} \mu_O g \mu_B g_K \mu_K \rho(r_K) \quad (5)$$

c. der HFS-Tensor

Für die drei Raumrichtungen eines Koordinatensystems ergeben sich verschiedene HFS-Beiträge. Die Hauptwerte des HFS-Tensors lassen sich durch Einkristallmessungen oder in günstigen Fällen aus Pulverspektren bestimmen.

Man erkennt hieraus sofort, daß infolge einer aus apparativen und theoretischen Gründen nicht unterschreitbaren Linienbreite bei größeren unsymmetrischen Radikalen die Auflösungsgrenze der EPR-Spektroskopie schnell erreicht ist. Im Grenzfall können nur noch breite einhüllende Resonanzlinien gemessen werden, aus denen obige Daten nicht mehr ohne weiteres entnommen werden können. Allein bei Messungen flüssiger Radikallösungen ergibt die Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit k Gruppen von N_k äquivalenten Kernen mit dem Kernspin I_k eine Liniendichte von

$$\Omega_{EPR} = \frac{n \sum_k (2 N_k I_k + 1)}{\sum_k |2 a_k N_k I_k|} \quad (6)$$

Dies bedeutet einen multiplikativen Anstieg der Linienzahl mit der Zahl der Kerne. Wird außerdem noch an festen Lösungen gemessen, d. h. die anisotropen Beiträge werden nicht mehr ausgemittelt, erhält man meist nur noch eine breite, alle Hyperfeinkomponenten einhüllende Linie.

2.2. Grundlagen der ENDOR-Spektroskopie

Eine geringere Liniendichte und damit auch die Möglichkeit der aussagekräftigen Anwendung bei komplizierteren Radikalen ist ein Vorteil der Doppelresonanzmethode Electron-Nuclear-Double-Resonance (ENDOR) /27,66/. Hier registriert man die

Intensitätsänderung eines teilweise gesättigten EPR-Signals bei zusätzlicher Bestrahlung mit einer Radiofrequenz.

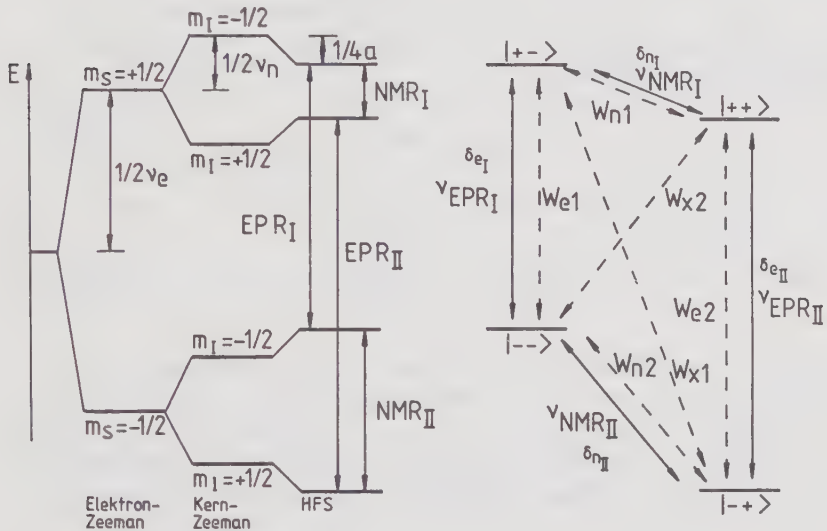


Abbildung 4. Termschema für ein Radikal mit $M_S = 1/2$, $M_I = 1/2$, $a > 0$ sowie ein vereinfachtes Vierniveau-Schema mit den möglichen EPR- und NMR-Übergängen

Durch partiell sättigende Einstrahlung der Resonanzfrequenz eines EPR-Überganges (z. B. $\nu_{EPR I}$, s. Abb. 4) wird eine annähernde Gleichbesetzung der dazugehörigen Energieniveaus $|+-\rangle$ und $|--\rangle$ erreicht, da die strahlungslosen Relaxationsübergänge (hier W_{e1}) nicht mehr erfolgreich mit den induzierten Übergängen (δ_{eI}) konkurrieren können. Das EPR-Signal verliert an Intensität. Wird eine Radiowelle der Frequenz eines Kernspinüberganges ($\nu_{NMR I}$) zusätzlich eingestrahlt, so eröffnet sich ein weiterer Relaxationsweg über W_{x2} oder W_{e2} und W_{n2} . Die Gleichbesetzung kann abgebaut werden, was eine Signalintensitätssteigerung zur Folge hat. Im ENDOR-Experiment wird nun die Intensitätsänderung des EPR-Signals in Abhängig-

keit von der Radiofrequenz registriert. Dies entspricht der Detektion eines EPR-Überganges mit Hilfe eines NMR-Experimentes. Damit wird die hohe Empfindlichkeit des EPR-Experimentes mit dem guten Auflösungsvermögen der NMR-Spektroskopie kombiniert.

Für eine Sorte von äquivalenten Kernen erhält man die beiden ENDOR-Resonanzfrequenzen

$$\nu = |\nu_N \pm a/2| \quad (7)$$

und für k Kernsorten eine Liniendichte von

$$\Omega_{\text{ENDOR}} = 2 k/a_{\text{max}} \quad (8)$$

Somit kann man im ENDOR-Experiment pro Satz äquivalenter Kerne zwei Linien symmetrisch um die entsprechende Kernfrequenz (für $\nu_N > a/2$) oder um die Frequenz der halben Kopplung (für $\nu_N < a/2$) messen (s. Abb. 5). Die Resonanzsignale lassen sich je nach ihrer Lage den verschiedenen Kernsorten zuordnen. Einige freie Kernfrequenzen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

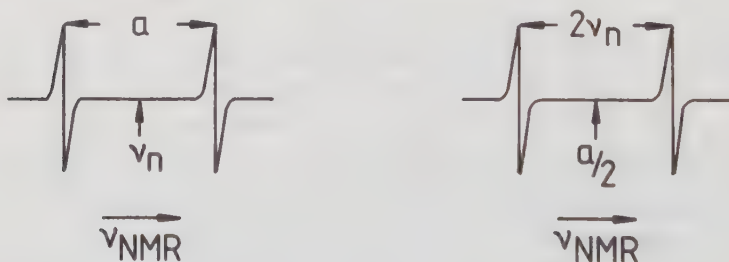


Abbildung 5. ENDOR-Signale für $\nu_N > |a/2|$ bzw. $|a/2| > \nu_N$

Der ENDOR-Effekt, d. h. die ENDOR-Signalintensität, hängt hauptsächlich ab von der Effizienz der alternativen Relaxationswege $\mathcal{W}_n$, $\mathcal{W}_e$ oder $\mathcal{W}_x$. Dies wirkt sich unterschiedlich auf die verschiedenen Kernsorten aus, so daß die ENDOR-Signalintensitäten nicht die Zahl der beteiligten Kerne wiedergeben. Das maximale ENDOR-Enhancement bei kleinen Kreuzrelaxations-

raten ω_x wird erreicht, wenn

$$\omega_e = \omega_n \quad . \quad (9)$$

ω_n ist direkt proportional zur Rotations-Korrelations-Zeit τ_R . Als Faktor geht hier die dipolare Anisotropie $\text{Tr} \{A^2\}$ in die Gleichung ein:

$$\omega_n \propto (\text{Tr} \{A^2\}) \tau_R \quad (10)$$

ω_e dagegen ist eine Funktion von $1/\tau_R$ mit der Spin-Rotations-Wechselwirkung B als Proportionalitätsfaktor:

$$\omega_e \propto B/\tau_R \quad (11)$$

Näherungsweise erhält man die Rotations-Korrelations-Zeit eines Moleküls in Lösung mit dem effektiven Molekylvolumen V_{eff} durch die Einstein-Debye-Beziehung:

$$\tau_R = V_{\text{eff}} \eta / k T \quad (12)$$

mit η = Viskosität des Lösungsmittels

k = Boltzmann-Konstante

T = absolute Temperatur

Hier wird die Beweglichkeit eines Teilchens mit einer bestimmten Größe in einem Medium der Viskosität η bei der Temperatur T beschrieben. Kombiniert man die Gleichungen 10, 11 und 12, so ergibt sich eine Abhängigkeit des ENDOR-Enhancements von der Meßtemperatur und der Viskosität des Lösungsmittels:

$$\omega_n/\omega_e = C (\eta/T)^2 \quad (13)$$

Da die Viskosität der meisten Lösungsmittel zusätzlich eine Funktion der Temperatur ist, läßt sich durch deren Variation

oft die Bedingung $\omega_e \approx \omega_n$ für ein maximales ENDOR-Signal erreichen. Somit sind der Spin-Rotations-Parameter B und die anisotrope dipolare HFS $\text{Tr} \{A'^2\}$ bestimmend für die Meßtemperatur. Für Systeme, bei denen ω_x -Prozesse eine größere Rolle spielen, gilt Gl. 13 nicht mehr. Hierzu gehören magnetische Kerne innerhalb eines π -Systems, die meist große Spinpopulation aufweisen (^{14}N bzw. ^{13}C) und einen großen anisotropen HFS-Anteil besitzen.

Plato et al /68/ berechneten die ENDOR-Signalamplitude Y_E als Funktion der Rotations-Korrelations-Zeit und erhielten für verschiedene Größen von $\text{Tr} \{A'^2\}$ die entsprechenden optimalen Rotations-Korrelations-Zeiten (s. Abb. 6). Somit erweist

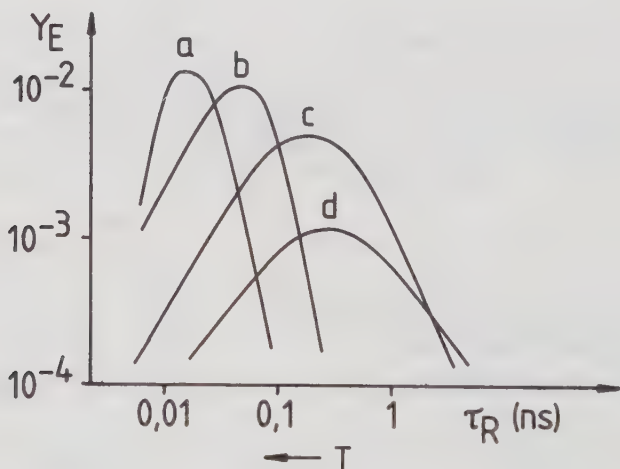


Abbildung 6. Berechnete ENDOR-Amplituden Y_E als Funktionen von τ_R für das Spinsystem $S = 1/2$, $I = 1/2$, $B = 10^{-6}$
a) $\text{Tr} \{A'^2\} = 10^3 \text{ MHz}^2$; b) $\text{Tr} \{A'^2\} = 10^2 \text{ MHz}^2$
c) $\text{Tr} \{A'^2\} = 10 \text{ MHz}^2$; d) $\text{Tr} \{A'^2\} = 1 \text{ MHz}^2$
Sättigungsparameter: $\sigma_e = 3$, $\sigma_n = 1$
weitere Parameter s. Lit. /68/

sich τ_R^{opt} als Funktion der Kerneigenschaften $\text{Tr} \{A^2\}$ und B:

$$\tau_R^{\text{opt}} = C (B/\text{Tr} \{A^2\})^{0,44} \quad (14)$$

mit $C = 200 \text{ ns}$

Aus diesen Berechnungen ergab sich weiterhin die optimale Feldstärke der Mikrowelle. Dazu wurde ein Sättigungsparameter von $\sigma_e = 3$ für einen maximalen ENDOR-Effekt angenommen:

$$B_e^{\text{opt}} [\text{mG}] = 300 (B \text{Tr} \{A^2\} [\text{MHz}^2])^{0,5} \quad (15)$$

Die RF-Feldstärke B_n^{opt} zur Erreichung eines Sättigungsparameters von $\sigma_n = 1$ (50% des theoretisch maximalen ENDOR-Signals; 40% Sättigungsverbreiterung der ENDOR-Linie) errechnete sich zu

$$(\nu_{\text{ENDOR}}/\nu_H) B_n^{\text{opt}} [\text{G}] = 100 (B \text{Tr} \{A^2\} [\text{MHz}^2])^{0,5}. \quad (16)$$

Hier muß das Hyperfein-Enhancement des RF-Feldes in Form eines Faktors $(\nu_{\text{ENDOR}}/\nu_H)$ berücksichtigt werden, da bei niedrigen Frequenzen größere Feldstärken benötigt werden als bei höheren.

Nach diesen Berechnungen erfordern Kerne mit hoher HFS-Anisotropie hohe Meßtemperaturen, große RF- sowie Mikrowellen-Leistungen und niedrig viskose Lösungsmittel. In Tabelle 1 sind einige Daten für typische Kerne in organischen Molekülradikalen angegeben.

Diese Ergebnisse gelten allerdings in guter Näherung nur für das Spinsystem $S = 1/2$, $I = 1/2$. Die Kombination mehrerer Kerne in einem Radikal führt natürlich zu komplizierteren Abhängigkeiten. Somit ist zwar die bessere spektrale Auflösung ein großer Vorteil der ENDOR-Spektroskopie gegenüber der EPR-Spektroskopie, denn eine genauere und detailliertere Auswertung ist möglich. Erkauft wird dies durch die geringere Empfindlichkeit gegenüber der EPR, von vielen Faktoren abhängende Meßbedingungen und Verlust der Information über die Anzahl äquivalenter Kerne.

Tabelle 1. Daten einiger in dieser Arbeit untersuchten Kerne

n^a	I	natürl. Häufigk. %	γ_n^b , rad/sG	ν_n^c , MHz	$10^{24}Q^d$, cm ²	$a_o^{ns^e}$, MHz	$Tr \{A^2\}^f$, MHz ²
1H	1/2	99,99	26751	14,00		1420	3400
2H	1	0,015	4106	2,15	0,00277	218	80
^{13}C	1/2	1,11	6726	3,52		3110	$4,95 \times 10^4$
^{14}N	1	99,63	1932	1,01	0,016	1540	$1,37 \times 10^4$
^{15}N	1/2	0,37	-2711	1,42		-2160	$2,70 \times 10^4$
^{19}F	1/2	100,0	25167	13,17		$4,79 \times 10^4$	$1,38 \times 10^7$
^{33}S	3/2	0,74	2052	1,07	-0,064	2715	$3,65 \times 10^4$

^aKernsorte^bGyromagnetisches Verhältnis^cfreie Kernfrequenz (bezogen auf $\nu_H = 14,00$ MHz)^dQuadrupolmoment^eIsotrope HFSC^fatomare dipolare Anisotropie2.3. Grundlagen der TRIPLE-Spektroskopie

Das Dreifachresonanz-Experiment TRIPLE /28,29/ eröffnet durch Einstrahlen einer zweiten RF-Frequenz in die paramagnetische Probe noch weitere effektive Relaxationswege und sorgt dadurch für spezifische Linienintensitätsänderungen (s. Abb. 7).

Special TRIPLE

Durch zusätzliche sättigende Einstrahlung der zweiten Resonanz-

Frequenz $\nu_{\text{NMR II}}$ (Abb. 4) einer Kopplung erreicht man, daß die Entsättigung des beobachteten EPR-Überganges noch effektiver als beim ENDOR-Experiment erfolgt. Nunmehr wird die ENDOR-Signalintensität nur noch durch ω_e sowie die induzierten Raten δ_e und δ_n bestimmt. Die RF-Frequenzen werden symmetrisch um ν_N eingestrahlt, und man erhält ein sehr intensives Signal bei der Frequenz $a/2$. Für den Fall, daß $\omega_e > \delta_n > \omega_n$, hängen die Linienintensitäten nicht mehr von dem verschiedenen Relaxationsverhalten der Kerne ab und geben nun die Anzahl der zum Übergang beitragenden Kerne wieder. Außerdem haben Experimente /69/ und Rechnungen /28,70/ eine Steigerung des Auflösungsvermögens gezeigt, da die NMR-Sättigungsverbreiterung der ENDOR-Linien hier bei gleicher RF-Leistung geringer ist.

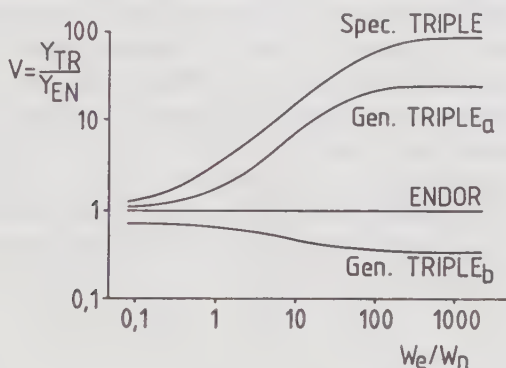


Abbildung 7. Relative TRIPLE-Amplituden bezogen auf die ENDOR-Amplitude $Y_{\text{EN}} = 1$ als Funktion von ω_e/ω_n ; zur Erklärung von Gen. TRIPLE_a und Gen. TRIPLE_b siehe Text

General TRIPLE

Beim General-TRIPLE-Experiment registriert man das ENDOR-Spektrum unter Einstrahlung einer konstanten zweiten RF-Frequenz, die zu einem ENDOR-Signal gehört, und beobachtet die Intensitätsänderung anderer Resonanzlinien. Aus den relativen Amplitudenänderungen der Signale gegenüber ENDOR lassen sich die

relativen Vorzeichen der Kopplungen entnehmen.

Das ENDOR-Spektrum eines Radikals mit z. B. zwei Protonensorten besteht aus vier Resonanzlinien symmetrisch um ν_H . Induziert man den hochfrequenten NMR-Übergang der Kopplung einer Protonensorte, so registriert man beim Durchfahren des RF-Feldes eine intensivere tieffrequente Linie dieser Kopplung gegenüber ENDOR (Abb. 7, Spec. TRIPLE). Zeigt das tieffrequente Signal zur Kopplung der anderen Protonensorte ebenfalls Intensitätssteigerung (Gen. TRIPLE_a) und die hochfrequente entsprechend Abnahme (Gen. TRIPLE_b), so besitzen die beiden HFSCs gleiche Vorzeichen. Bei umgekehrten Vorzeichen würden die Linien der HFSCs entgegengesetztes Verhalten zeigen.

Aus theoretischen Überlegungen lassen sich einige Vorzeichen meist schon vorher festlegen. Man kann aus den gemessenen relativen dann alle absoluten Vorzeichen bestimmen. Da den Spindichte-Transfer-Theorien zufolge die Vorzeichen der Kopplungskonstanten von α - und β -Protonen meist verschieden sind, läßt sich auf diese Weise auch eine indirekte Zuordnung der HFSCs zu Molekülpositionen durchführen.

Weiterhin reagieren nur die Resonanzlinien durch Amplitudenänderung, deren entsprechende Energieniveaus durch Relaxationswege miteinander verbunden sind. Somit können die ENDOR-Signale von verschiedenen Radikalen in einer Probe voneinander unterschieden werden.

2.4. ENDOR-induced EPR (EIE)

Positioniert man die Radiofrequenz auf die Spitze einer ENDOR-Linie und fährt das Magnetfeld über den EPR-Absorptionsbereich, so erhält man ein EIE-Spektrum. So können bei Vorliegen mehrerer Radikalspezies in der zu messenden Probe die EIE-Spektren der einzelnen Arten getrennt aufgenommen und somit ihre ENDOR-Signale selektiert werden /71/.

2.5. ENDOR in gefrorenen Lösungen

Wie bereits berichtet, werden infolge der Brownschen Molekularbewegung für Radikale mit geringer Anisotropie und kleinem Volumen in isotropen flüssigen Lösungen die anisotropen Anteile der Hyperfeinkonstanten und die des g-Faktors weitgehend ausgemittelt, was zu scharfen einzelnen Resonanzlinien in EPR- und ENDOR-Spektren für alle Sorten von Protonen führt. Die Linienbreiten und die Intensitäten der ENDOR-Linien, die hauptsächlich von den Relaxationszeiten abhängen, lassen Rückschlüsse auf die Art der Kerne zu (α -, β -Protonen, Gerüstatome).

Wird die Bewegungsfähigkeit der Radikale eingeschränkt wie in flüssigen Kristallen /72/ oder weitgehend unterbunden, wie es beim Einfrieren der Lösung, in polykristalliner Matrix /53,73/, in Pulvern oder im Einkristall der Fall ist, so unterscheiden sich die Moleküle in ihren Orientierungen zum äußeren magnetischen Feld. Nun können ihre anisotropen Hyperfeinkonstanten und g-Faktoren gemessen werden. Allerdings ist dazu ein großer experimenteller und rechnerischer Aufwand erforderlich. Der Spin-Hamilton-Operator zur Errechnung der Energie-Eigenwerte /74/ enthält in diesem Falle gerichtete Größen wie Vektoren und Tensoren:

$$\hat{H} = \tilde{g} \mu_B \tilde{B}_0 \hat{S} - g_K \mu_K \tilde{B}_0 \hat{I} + h \hat{S} \tilde{A} \hat{I} \quad (17)$$

$$\tilde{A} = \begin{vmatrix} A_{xx} & A_{xy} & A_{xz} \\ A_{yx} & A_{yy} & A_{yz} \\ A_{zx} & A_{zy} & A_{zz} \end{vmatrix} \quad (18)$$

$\tilde{A}$ ist der Hyperfeintensor und besteht aus neun Komponenten, die den Kopplungen im kartesischen Koordinatensystem zwischen den Vektoren des Kernspins I und des Elektronenspins S entsprechen. $\tilde{g}$ repräsentiert ebenfalls einen Tensor für die verschiedenen Raumkomponenten des g-Faktors.

Es existiert immer ein ausgezeichnetes Koordinatensystem x' , y' , z' , in dem der Hyperfeintensor Diagonalgestalt hat,

d. h. $A_{ab} (a \neq b) = 0$.

$$\tilde{A} = \begin{bmatrix} A_{xx}' & 0 & 0 \\ 0 & A_{yy}' & 0 \\ 0 & 0 & A_{zz}' \end{bmatrix} \quad (19)$$

Wenn das äußere Magnetfeld B_0 parallel zur z-Achse liegt und eine Näherung für hohes Magnetfeld angenommen wird, ergibt sich

$$\hat{H} = g \mu_B B_z S_z - g_K \mu_K B_z I_z + h(S_z A_{zx} I_x + S_z A_{zy} I_y + S_z A_{zz} I_z) \quad (20)$$

mit den Energie-Eigenwerten

$$E = 1/2 g \mu_B B_z \pm 1/4 h \sqrt{A_{zx}^2 + A_{zy}^2 + A_{zz}^2} \quad (21)$$

$$E = -1/2 g \mu_B B_z \pm 1/4 h \sqrt{A_{zx}^2 + A_{zy}^2 + A_{zz}^2} \quad (22)$$

Hieraus lassen sich die ENDOR-Übergangsfrequenzen zu

$$\nu = \nu_N \pm R/2 \quad R = (A_{zx}^2 + A_{zy}^2 + A_{zz}^2)^{0,5} \quad (23)$$

berechnen. Die Daten aus den ENDOR-Übergangsfrequenzen ergeben sich als Summen des isotropen und des anisotropen Anteils der Kopplungen; für die Diagonalelemente gilt:

$$A_{xx} = A'_{xx} + a_{iso} \quad (24)$$

$$A_{yy} = A'_{yy} + a_{iso} \quad (25)$$

$$A_{zz} = A'_{zz} + a_{iso} \quad (26)$$

Bei Kenntnis der isotropen Kopplungen kann man hieraus die anisotropen Werte ermitteln. Die isotrope Kopplung muß entweder

separat bestimmt werden oder läßt sich aus

$$a_{\text{iso}} = 1/3(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz}) \quad (27)$$

errechnen. Man erkennt, daß sich die Spur des dipolaren Teils des HFS-Tensors zu Null ergibt. Dies erklärt, daß anisotrope Beiträge zur Hyperfeinkopplung in flüssigen isotropen Lösungen durch schnelle statistische Molekularbewegungen ausgemittelt werden können.

Leider lassen sich exakte Messungen nur an in Einkristallen eingebauten Radikalen durchführen, wo die Achsen der makroskopischen Probe, d. h. x, y und z, bekannt und definiert sind. In Pulvern und gefrorenen Lösungen sind die Moleküle statistisch regellos orientiert, und somit geben die Meßwerte jeweils die Überlagerung der Hyperfeinwerte aller in der Probe befindlichen, verschieden ausgerichteten Radikale wieder. Man erhält schlecht aufgelöste EPR- und ENDOR-Spektren mit großen Linienbreiten und geringen Intensitäten (die Linienbreiten sind etwa zehnmal größer als in isotropen Lösungen).

ENDOR-Resonanzlinien mit großen Amplituden sollten von Kernen mit relativ geringen Anisotropien erhalten werden können/75/. α -Protonen besitzen in der Regel relativ hohe Anisotropien, die bis zur halben isotropen Kopplungskonstanten anwachsen können, so daß Absorptionssignale z. B. bei $a/2$, a und $3/2 a$ auftreten mit entsprechend verminderter Intensität. Ihr Nachweis in gefrorenen Lösungen ist stark erschwert.

Methylprotonen von Radikalmolekülen rotieren sogar bei Temperaturen von 77 K /76,77/ noch so schnell, daß die drei Protonen äquivalent sind. Ihre Anisotropie bleibt klein (ca. 10% der isotropen Kopplung). Die Ergebnisse des ENDOR-Experimentes hängen höchstens von der Orientierung des gesamten Moleküls ab. β -Protonen von frei rotierenden Methyl-Gruppen lassen sich somit in regellos orientierten Matrices relativ gut durch intensitätsstarke Resonanzlinien nachweisen.

Für Gerüst-atome wie hier ^{13}C oder ^{14}N gelten noch andere Bedingungen, da ihre Anisotropien im allgemeinen sehr groß sind.

Die verschiedenen Richtungskomponenten der Hyperfeintensoren

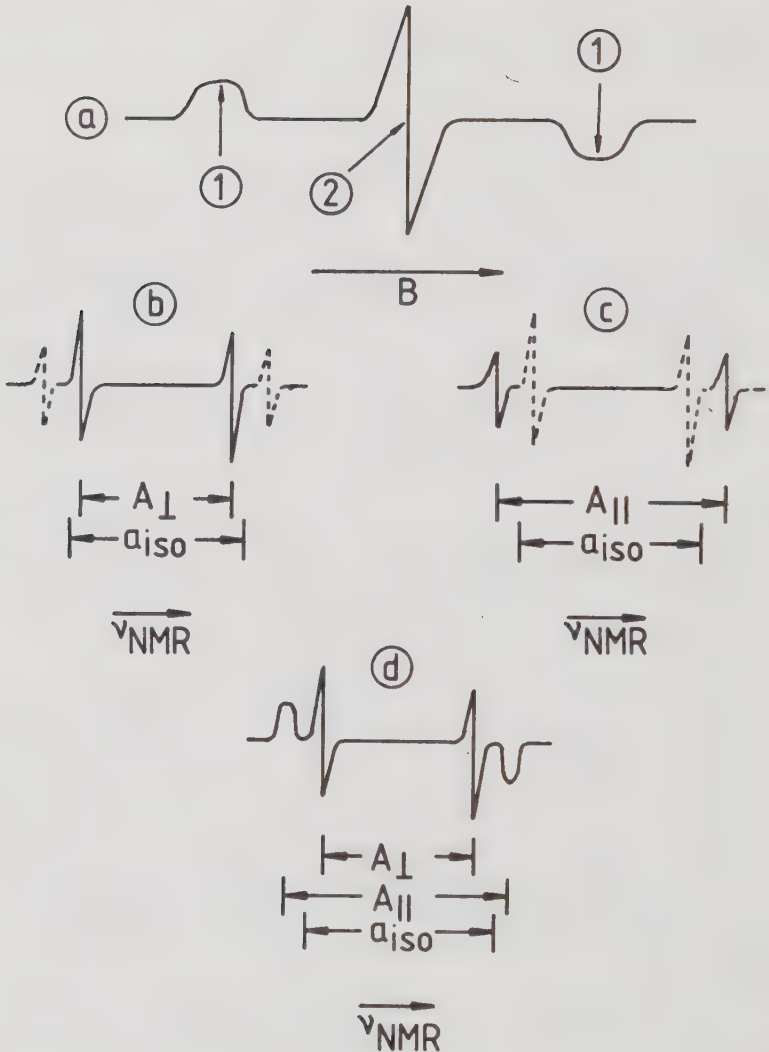


Abbildung 8. a) EPR-Spektrum eines Radikals mit $S = 1/2$ und $I = 1/2$ in gefrorener Lösung
 b,c) ENDOR-Spektren dieses Radikals bei Positionierung des EPR-Feldes auf 2 (b) bzw. 1 (c)
 d) ENDOR-Spektrum eines Radikals mit $S = 1/2$ und $I = 1$ bei Positionierung des Feldes auf 2

lassen sich in den EPR-Spektren bei Pulvermessungen z. B. unterscheiden, wenn die HFS-Anisotropie eines Kernes mit $I = 1/2$ dominiert. Hier kann man in den Zentren der EPR-Spektren die HFS-Komponenten $A_{\perp}$ senkrecht zum äußeren Feld nachweisen (Abb. 8a, 2; definitionsgemäß liegt die Molekülachse z senkrecht zur Molekülebene, so daß hier die Komponenten A_{xx} und A_{yy} gemessen werden). Die HFS-Komponenten $A_{\parallel}$ parallel zum Feld (Abb. 8a, 1; also A_{zz}) gibt Anlaß zu Resonanzlinien im höheren bzw. tieferen Feld des Spektrums.

Positioniert man das Magnetfeld auf das Zentrum des EPR-Spektrums (2), so erhält man im ENDOR-Experiment nur die Resonanzlinien für $A_{\perp}$ (Abb. 8b), während man $A_{\parallel}$ messen kann, wenn die z -Komponenten des EPR-Spektrums gesättigt werden (Abb. 8c). Für Radikale mit Kernen eines Kernspins $I > 1/2$ lassen sich diese Unterschiede im EPR-Spektrum nach Richtungskomponenten des HFS-Tensors nicht mehr ohne weiteres erkennen. Es treten zum Beispiel für ^{14}N mit $I = 1$ EPR-Resonanzlinien für die Kernspinzustände $M_I = +1, 0$ und -1 auf. In der Mitte eines EPR-Spektrums findet man die Komponenten für $M_I = 0$, die nun nicht mehr nach ihren verschiedenen Orientierungen unterschieden werden können. Für $M_I = \pm 1$ können allerdings auf den Flanken des Spektrums selektiv Komponenten parallel zum Feld gemessen werden. So zeigen die ENDOR-Experimente für Sättigung des Zentrums des EPR-Signals sämtliche HFS-Komponenten (Abb. 8d), während die Positionierung der ENDOR-Signale für $A_{\perp}$ in Form eines einkristallartigen Spektrums zuläßt (Abb. 8b).

Außer diesen ENDOR-Signalen enthält das Spektrum von gefrorenen Lösungen meist intensive Signale bei den freien Kernfrequenzen. Sie stammen von den rein dipolaren Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons mit magnetisch aktiven Kernen in einer Entfernung von bis zu 0,6 nm zum radikalischen Zentrum /76,78/. Es handelt sich um Atome der Matrix (Lösungsmittel) und/oder um Kerne von anderen diamagnetischen Molekülen in der Matrix.

2.6. Spindichte-Transfer-Mechanismen

2.6.1. α -Protonen

Befindet sich das ungepaarte Elektron in einem σ -Orbital, so ergibt sich eine gewisse Aufenthaltswahrscheinlichkeitsdichte $\rho(I)$ am Ort des zugehörigen Kerns und damit eine meßbare Kopplungskonstante des Elektrons mit diesem Kern.

Bei den hier gemessenen Radikalen handelt es sich allerdings um π -Radikale, bei denen das einzelne Elektron in einem π -Orbital ist. Alle Kerne im System, die in der Knotenebene dieser Orbitale liegen, sollten daher keine meßbaren Wechselwirkungen mit dem Elektron zeigen. Die trotzdem teilweise großen Kopplungskonstanten von α -Protonen erklärt man mit dem π - σ -Spinpolarisationsmechanismus /79/. Aufgrund der Hundschen Regel ist der Spinzustand 1 in Abbildung 9 eines CH-Radikal-Fragmentes etwas energieärmer als Zustand 2, da beide Elektronen am Kohlenstoffatom parallele Spins besitzen. Man kann von einer Triplett-Konfiguration sprechen. Bei 2 (Abb. 9) haben die Elektronen umgekehrte Spins (Singulett-Zustand). Es hat also in 1 eine Spinpolarisation der Elektronen der σ -Bindung stattgefunden. Am Ort des Protons kann man eine Spindichte

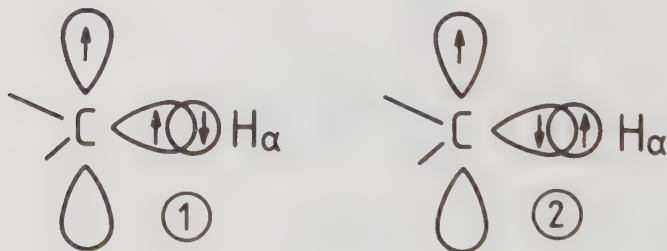


Abbildung 9. CH-Fragment eines Kohlenwasserstoffradikals

nachweisen, deren Vorzeichen entgegengesetzt zu dem der Spindichte am benachbarten C-Atom ist. Die α -Protonen-Kopplungskonstante ist nach McConnell proportional zur Spinpopulation am Kohlenstoffatom /80-83/:

$$a_H = Q_{C-H}^H \rho_C \quad (28)$$

Nach dem oben beschriebenen Mechanismus muß Q_{C-H}^H negativ sein und beträgt etwa -2,25 mT bis -3 mT. Im allgemeinen sollte also die Kopplungskonstante für α -Protonen ein negatives Vorzeichen tragen, wenn nicht durch Spinentkopplung (π - π -Spinpolarisation) aller übrigen p-Elektronen der π -Bindungen im Molekül negative Spinpopulationen auftreten /83-89/.

2.6.2. β -Protonen

Zur Erklärung der Kopplungskonstanten von β -Protonen reicht das π - σ -Spinpolarisationsmodell nicht aus. Da die β -Protonen-Kopplungen oft ähnlich groß, wenn nicht sogar größer als α -Protonen-HFSCs und winkelabhängig sind, kann nur das Hyperkonjugationsmodell /90/ derart große Spindichten am Ort der β -Protonen beschreiben. Hier werden die β -Protonen z. B. einer Methylgruppe als ein Pseudo-Heteroatom H_3 behandelt (s. Abb. 10). Nach Linearkombination der drei 1s-Orbitale der Wasserstoffatome entsteht unter anderen ein Gruppenorbital, das aufgrund seiner Symmetrie in Konjugation mit dem π -Orbital am Kohlenstoff, in dem das ungepaarte Elektron ist, treten kann.



Abbildung 10. Fragment des Radikals $\cdot\text{C}-\text{CH}_3$

Das führt zu einer Spindichte am β -Proton, die das gleiche Vorzeichen wie die des betreffenden Gerüst-C-Atoms hat. Nach McConnell /91,92/ ist die Kopplungskonstante des β -Protons

abhängig von dem Dieder-Winkel zwischen der Achse des p_z -Orbitals und der C-H β -Bindung (s. Abb. 11):

$$a_{\text{CH}\beta} = \rho_{\text{C}} B_{\text{C-CH}\beta}^{\text{H}} \cos^2 \vartheta \quad (29)$$

$B_{\text{C-CH}\beta}^{\text{H}}$ ist ein positiver Wert von ca. 5,6 mT bis 6 mT. $\cos^2 \vartheta$ wird bei frei rotierenden Methylgruppen zu 1/2 gemittelt, so daß hier gilt:

$$a_{\text{CH}_3} = \rho_{\text{C}} 1/2 B_{\text{C-CH}_3}^{\text{H}} \quad (30)$$

Bei größeren Substituenten mit behinderter Rotation wird $\cos^2 \vartheta$ nicht gemittelt, so daß stark abweichende Werte je nach Stellung der Protonen zum π -Orbital des ungepaarten Elektrons gemessen werden können.

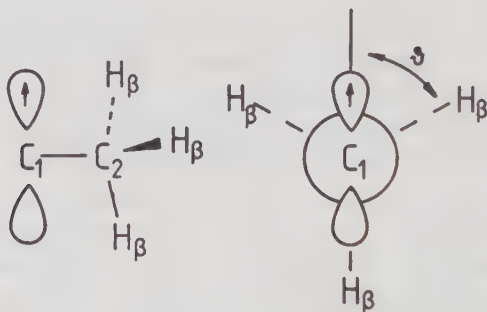


Abbildung 11. Struktur des Radikalfragmentes $\cdot\text{C-CH}_3$

2.6.3. γ -Protonen

Der Spindichte-Transfer-Mechanismus bis hin zu γ -Protonen ist noch nicht endgültig geklärt /93-95/. Die Kombination von

Hyperkonjugation und π - σ -Spinpolarisation kann je nach Überwiegen eines der beiden Mechanismen zu positiven oder negativen γ -Protonen-Kopplungen führen. Das Resultat hängt stark von der vorliegenden Geometrie ab.

2.7. Elektrochemische Erzeugung von Radikalen

Im allgemeinen werden Radikale durch Umsetzen eines diamagnetischen Moleküls mit starken Reduktionsmitteln (Kalium, Natrium) /96/ oder starken Oxidationsmitteln (Schwefelsäure) /97/ dargestellt. Es handelt sich meist um reine Redoxreaktionen. Man kann paramagnetische Spezies ebenso durch elektrolytische Verfahren erzeugen. Dies wird zum Beispiel bei der Kolbe-Synthese /98/ ausgenutzt, wo nach anodischer Oxidation eines Carboxylat-Anions als reaktive Zwischenstufe ein Radikal entsteht, das zu einem Alkan dimerisieren kann. Der Vorteil der elektrochemischen Methode gegenüber den chemischen Verfahren ist das regelbare Potential und damit eindeutige und reproduzierbare Bedingungen zur Darstellung einzelner Spezies.

Für die elektrolytische Erzeugung von Radikalen ist ebenso wie für die Metallelektrolyse das Faradaysche Gesetz gültig:

$$Q = z F n \quad (31)$$

mit Q = Ladungsmenge

z = pro Molekül Übertragende Anzahl von Elektronen

F = Faraday-Konstante (96 496 A s/val)

n = Anzahl der Mole

Es erlaubt die Errechnung der benötigten Ladungsmenge. Das Potential, das für den Elektronentransfer benötigt wird, ist abhängig von Moleküleigenschaften der Radikalvorstufen (z. B. E_0) und der Konzentration aller beteiligten Partikel. Die Nernstsche Gleichung beschreibt diese Funktion:

$$E = E_0 + \frac{R T}{z F} \ln a_{\text{ox}}/a_{\text{red}} \quad (32)$$

mit E_0 = Normalpotential unter Standardbedingungen

R = Gaskonstante

a_{ox} = Aktivitäten der oxidierten Teilchen

Der während der Elektrolyse fließende Strom ergibt sich hauptsächlich aus den Diffusionseigenschaften der beteiligten Teilchen. Große Moleküle mit Solvathüllen diffundieren sehr viel langsamer durch das Lösungsmittel, was zu geringeren Strömen bei gleicher Spannung führt. Dies bedeutet längere Zeiten für die Elektrolyse. Änderungen der Werte können ebenfalls durch zwischengeschaltete Gleichgewichte und Nebenreaktionen hervorgerufen werden.

Für die EPR- und ENDOR-Spektroskopie ist es wichtig, daß der Elektronentransfer zur Darstellung eines Radikals reversibel verläuft. Dies läßt sich sehr gut durch Aufnahme eines cyclischen Voltammogramms überprüfen, in dem die Stromspannungskurve des Systems bis zu einem Umkehrpunkt für die Reduktion und wieder zurück für die Oxidation gemessen wird (s. Abb. 12). Ein symmetrischer Verlauf der Stromspannungskurve für Oxidation und Reduktion deutet auf einen reversiblen Redoxprozeß hin. Läßt sich für eine der beiden Reaktionen keine Stromänderung erkennen, so ist der Vorgang irreversibel. Die elektrolytische Erzeugung des Radikals zur spektroskopischen Untersuchung ist dann meist nicht durchführbar.

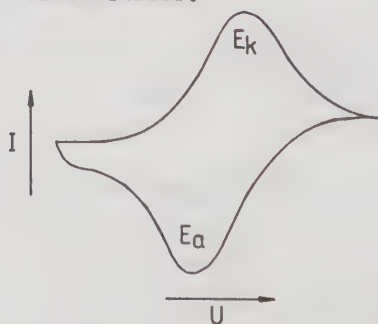


Abbildung 12. Cyclisches Voltammogramm eines reversiblen Redoxprozesses

E_k = Potential der kathodischen Reduktion

E_a = Potential der anodischen Oxidation

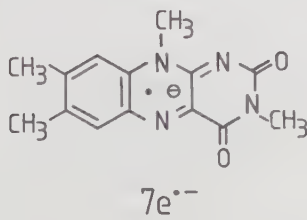
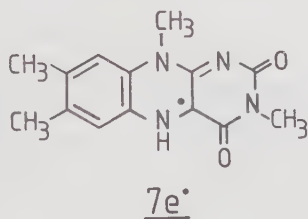
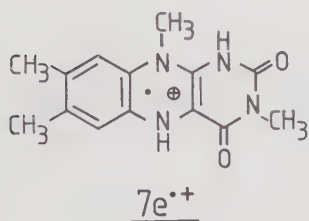
3. Spezieller Teil

3.1. Namen und Strukturen der untersuchten und dargestellten

Verbindungen

Aus dem Substanzenschlüssel sind die Strukturen der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten bzw. untersuchten Verbindungen zu entnehmen. Eine Verbindung wird hier durch eine Zahl einer bestimmten Verbindungsklasse zugeordnet (z. B. Isoalloxazine 7). Ein nachfolgender kleiner Buchstabe charakterisiert entsprechend Tab. 3 bis 6 diese Substanz mit ihren Substituenten R^1 bis R^6 . Der Abbildung ist die Stellung der Substituenten R^1 bis R^6 in den einzelnen Molekülsorten zu entnehmen.

Ähnliche Chiffren werden für die paramagnetischen Stufen dieser Verbindungen benutzt. Ohne Berücksichtigung des Protonierungszustandes der Radikale werden Radikalkationen mit $\cdot^+$, Neutralradikale mit $\cdot$ und Anionradikale mit $\cdot^-$ bezeichnet. So ist z. B. das Lumiflavin-Kationradikal $7e^+$, das entsprechende Neutralradikal $7e^\cdot$ und das Anionradikal $7e^{\cdot-}$. Wichtige Änderungen der Strukturen für besondere Untersuchungen der Radikale werden im Text ausdrücklich beschrieben.



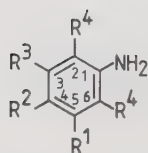
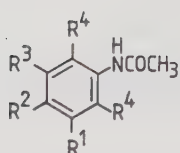
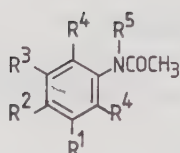
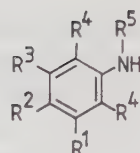
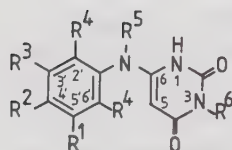
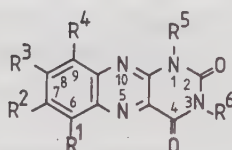
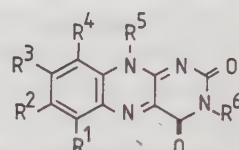
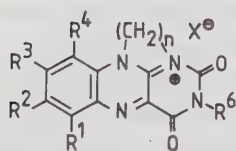
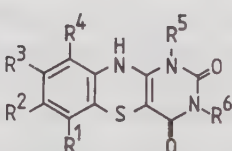
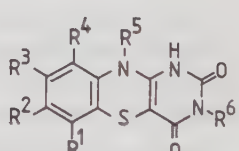
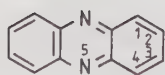
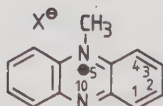
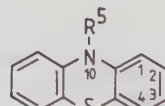
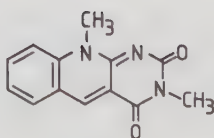
1234567891011121314

Tabelle 2. Rationale Namen der untersuchten Verbindungen

<u>6a</u>	Benzo [g] pteridin-2,4(1H,3H)dion = {A}
<u>6b</u>	3,7-Dimethyl-{A}
<u>6c</u>	3,8-Dimethyl-{A}
<u>6d</u>	3,6,8-Trimethyl-{A}
<u>6e</u>	3,7,8-Trimethyl-{A}
<u>6f</u>	3,7,8-Trimethyl-9-d-{A}
<u>6g</u>	3,7,8-Trimethyl-6,9-d ₂ -{A}
<u>6j</u>	7,8-Dimethyl-{A}
<u>7a</u>	3,10-Dimethyl-benzo [g] pteridin-2,4(3H,10H)dion = 3,10-Dimethyl-{B}
<u>7b</u>	3,7,10-Trimethyl-{B}
<u>7c</u>	3,8,10-Trimethyl-{B}
<u>7d</u>	3,6,8,10-Tetramethyl-{B}
<u>7e</u>	3,7,8,10-Tetramethyl-{B}
<u>7f</u>	3,7,8,10-Tetramethyl-9-d-{B}
<u>7g</u>	3,7,8,10-Tetramethyl-6,9-d ₂ -{B}
<u>7h</u>	3,7,8,-Trimethyl-10-methyl-d ₃ -{B}
<u>7i</u>	3-Methyl-d ₃ -7,8,10-trimethyl-{B}
<u>7j</u>	7,8,10-Trimethyl-{B}
<u>7k</u>	3,7,10-Trimethyl-8-brom-{B}
<u>7l</u>	3,8,10-Trimethyl-7-brom-{B}
<u>7m</u>	3,7,10-Trimethyl-8-hydroxymethyl-{B}
<u>7n</u>	3,10-Benzyl-{B}
<u>7o</u>	3-Methyl-10-hydroxymethyl-{B}
<u>7p</u>	7,8-Dimethyl-10-(D-ribityl)-{B}
<u>7q</u>	7,8-Dimethyl-10-(D-tetraacetylribityl)-{B}
<u>7r</u>	7-Methyl-8 α -morpholinomethyl-10-(D-tetraacetylribityl)-{B}
<u>7s</u>	7-Methyl-10-(D-tetraacetylribityl)-{B}
<u>7t</u>	7,8-Dimethyl-10-(D-ribityl-phosphat)-{B}
<u>7u</u>	7,8-Dimethyl-10-(adenosyl-D-ribityl-phosphat)-{B}
<u>7v</u>	3-Ethoxyacetyl-7,8,10-Trimethyl-{B}
<u>7w</u>	3,10-Dimethyl-4a ¹³ C- {B}
<u>7x</u>	2- ¹³ C-3,7,8,10-Tetramethyl- {B}
<u>7y</u>	1,3- ¹⁵ N ₂ -3,7,8,10-Tetramethyl- {B}
<u>7z</u>	7,8,10-Trimethyl-10- ¹⁵ N- {B}

- 8a 3-Methyl-1.10-ethano-{B} ium-perchlorat
8b 3-Methyl-1.10-propano-{B} ium-perchlorat
9a 3-Methyl- 2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-1H-pyrimido-
 [5,4-b][1,4] benzothiazin = 3-Methyl-{C}
9e 3,7,8-Trimethyl-{C}
9j 1,3-Dimethyl-{C}
10a 3,10-Dimethyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydro-10H-pyrimido-
 [5,4-b][1,4] benzothiazin = 3,10-Dimethyl-{D}
10b 3,7,10-Trimethyl-{D}
10c 3,8,10-Trimethyl-{D}
10d 3,6,8,10-Tetramethyl-{D}
10e 3,7,8,10-Tetramethyl-{D}
10f 3,7,8,10-Tetramethyl-9-d-{D}
10g 3,7,8,10-Tetramethyl-6,9-d₂-{D}
10h 3,7,8-Trimethyl-10-methyl-d₃-{D}
10k 3,7,10-Trimethyl-8-methoxy-{D}
10l 3,7,10-Trimethyl-8-acetamino-{D}
10m 3,7,8-Trimethyl-10-ethyl-{D}
10n 3-Methyl-10-benzyl-{D}
10o 3-Methyl-10-allyl-{D}
10q 3,7,8-Trimethyl-10-(D-tetraacetylribityl)-{D}
10v 3,6,7,10-Tetramethyl-{D}
10w 3,6,7-Trimethyl-10-(D-tetraacetylribityl)-{D}
11 Dibenzopyrazin
12 9-Methyl-dibenzopyrazinium-sulfonsäure-methylester
13a Dibenzo-1,4-thiazin = {E}
13b 1-Methyl-{E}
13c 1-(3-Dimethylamino)-propyl-{E}
13d 1-(3-Dimethylamino-2-methyl)-propyl-{E}
14 3,10-Dimethyl-5-deaza-benzo [g] pteridin-2,4(3H,10H)dion

Die Buchstaben wurden so zugeordnet, daß gleich substituierte Verbindungen möglichst den gleichen Buchstaben erhalten.

Tabelle 3. Substitution der im Rahmen der vorliegenden Arbeit dargestellten Vorstufen

Nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
<u>1a</u>	H	H	H	H	H	
<u>1b</u>	H	CH ₃	H	H	H	
<u>1c</u>	H	H	CH ₃	H	H	
<u>1d</u>	CH ₃	H	CH ₃	H	H	
<u>1e</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	H	
<u>2a</u>	H	H	H	H	H	
<u>2b</u>	H	CH ₃	H	H	H	
<u>2c</u>	H	H	CH ₃	H	H	
<u>2d</u>	CH ₃	H	CH ₃	H	H	
<u>2e</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	H	
<u>3a</u>	H	H	H	H	CH ₃	
<u>3b</u>	H	CH ₃	H	H	CH ₃	
<u>3c</u>	H	H	CH ₃	H	CH ₃	
<u>3d</u>	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	
<u>3e</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	
<u>4a</u>	H	H	H	H	CH ₃	
<u>4b</u>	H	CH ₃	H	H	CH ₃	
<u>4c</u>	H	H	CH ₃	H	CH ₃	
<u>4d</u>	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	
<u>4e</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	
<u>5a</u>	H	H	H	H	H	CH ₃
<u>5b</u>	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃
<u>5c</u>	H	H	CH ₃	H	H	CH ₃
<u>5d</u>	CH ₃	H	CH ₃	H	H	CH ₃
<u>5e</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃
<u>5f</u>	H	H	H	H	CH ₃	CH ₃
<u>5g</u>	H	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃
<u>5h</u>	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>5i</u>	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>5j</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃

Tabelle 4. Substitution der untersuchten Alloxazine und Isoalloxazine

Nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
<u>6a</u>	H	H	H	H	H	H
<u>6b</u>	H	CH ₃	H	H	H	CH ₃
<u>6c</u>	H	H	CH ₃	H	H	CH ₃
<u>6d</u>	CH ₃	H	CH ₃	H	H	CH ₃
<u>6e</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃
<u>6f</u>	H	CH ₃	CH ₃	D	H	CH ₃
<u>6g</u>	D	CH ₃	CH ₃	D	H	CH ₃
<u>6j</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	H	H
<u>7a</u>	H	H	H	H	CH ₃	CH ₃
<u>7b</u>	H	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃
<u>7c</u>	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>7d</u>	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>7e</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>7f</u>	H	CH ₃	CH ₃	D	CH ₃	CH ₃
<u>7g</u>	D	CH ₃	CH ₃	D	CH ₃	CH ₃
<u>7h</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CD ₃	CH ₃
<u>7i</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CD ₃
<u>7j</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H
<u>7k</u>	H	CH ₃	Br	H	CH ₃	CH ₃
<u>7l</u>	H	Br	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>7m</u>	H	CH ₃	CH ₂ OH	H	CH ₃	CH ₃
<u>7n</u>	H	H	H	H	CH ₂ - ψ	CH ₂ - ψ
<u>7o</u>	H	H	H	H	CH ₂ CH ₂ OH	CH ₃
<u>7p</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	R ^A	H
<u>7q</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	R ^B	H
<u>7r</u>	H	CH ₃	R ^C	H	R ^B	H
<u>7s</u>	H	CH ₃	H	H	R ^B	H
<u>7t</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	R ^D	H
<u>7u</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	R ^E	H
<u>7v</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	R ^F
<u>7w</u>	H	H	H	H	CH ₃	CH ₃
<u>7x</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃

Fortsetzung Tabelle 4.

Nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
<u>7y</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>7z</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H

R^A = D-RibitylR^B = D-TetraacetylribitylR^C = 8α-morpholinomethylR^D = D-Ribityl-phosphatR^E = Adenosyl-D-ribityl-phosphatR^F = AcetethoxyTabelle 5. Substitution der untersuchten Thiaalloxazine und Thiaisoalloxazine

Nr.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶
<u>9a</u>	H	H	H	H	H	CH ₃
<u>9e</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃
<u>9j</u>	H	H	H	H	CH ₃	CH ₃
<u>10a</u>	H	H	H	H	CH ₃	CH ₃
<u>10b</u>	H	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃
<u>10c</u>	H	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>10d</u>	CH ₃	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>10e</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>10f</u>	H	CH ₃	CH ₃	D	CH ₃	CH ₃
<u>10g</u>	D	CH ₃	CH ₃	D	CH ₃	CH ₃
<u>10h</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CD ₃	CH ₃
<u>10k</u>	H	CH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>10l</u>	H	CH ₃	NHCOCH ₃	H	CH ₃	CH ₃
<u>10m</u>	H	CH ₃	CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	CH ₃
<u>10o</u>	H	H	H	H	CH ₂ CHCH R ^B	CH ₃
<u>10q</u>	H	CH ₃	CH ₃	H		CH ₃
<u>10n</u>	H	H	H	H	CH ₂ -φ	CH ₃
<u>10v</u>	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃
<u>10w</u>	CH ₃	CH ₃	H	H	R ^B	CH ₃

Tabelle 6. Substitution der untersuchten Phenothiazin-Derivate

Nr.	R ⁵
<u>13a</u>	H
<u>13b</u>	CH ₃
<u>13c</u>	CH ₂ CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂
<u>13d</u>	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ N(CH ₃) ₂

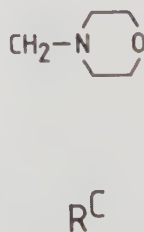
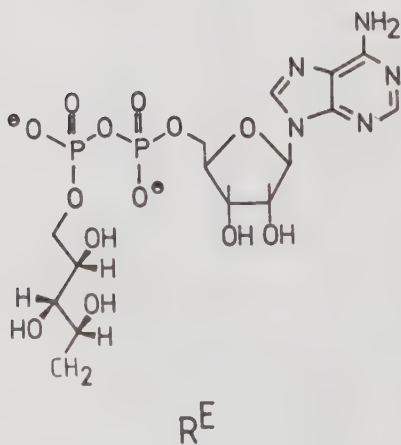
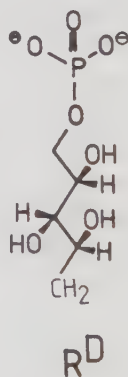
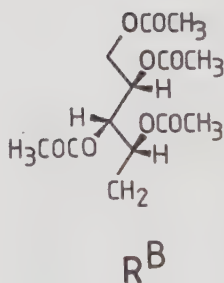
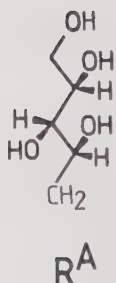
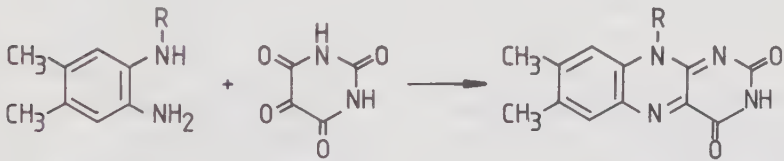


Abbildung 13. Struktur der Substituenten R^A bis R^E

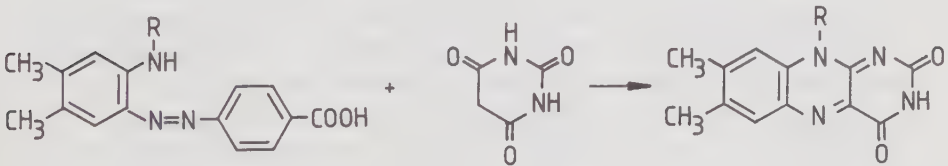
3.2. Synthesen der Verbindungen

3.2.1. Alloxazine und Isoalloxazine

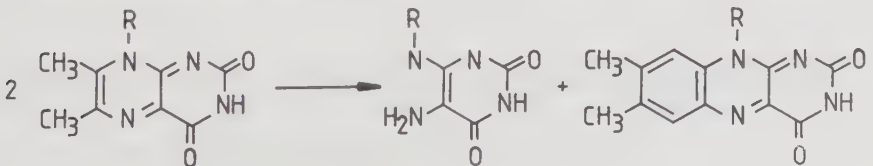
Blyth konnte erstmals 1879 das Riboflavin als gelben Farbstoff aus Molke extrahieren /99/. Zwischenzeitlich gibt es sehr viele verschiedene Möglichkeiten, Flavine durch Totalsynthesen darzustellen. So gelang es Kuhn, Weygand und Karrer 1938, Lumiflavin aus 1,2-Dimethyl-4-amino-5-methylaminobenzol und Alloxan zu synthetisieren und damit die Isoalloxazin-Struktur zu sichern /100/.



Eine bessere Ausbeute erhielt Tischler durch Kupplung eines Azofarbstoffes mit der entsprechenden Barbitursäure /101/.



Ähnlich der Biosynthese konnten Flavine ebenfalls aus zwei Pteridinen gewonnen werden /102/.



Für die im Rahmen dieser Arbeit zu synthetisierenden Verbindungen erwies sich der Weg von Yoneda /103,104/ als der beste. Eine anfallende Zwischenstufe, das 6-Anilinouracil (5), kann nämlich zur Darstellung anderer Flavin-Analoga wie die 5-Thiaflavine (10) und die Deazaflavine (14) ebenfalls eingesetzt werden. Außerdem ist die Produktion von deuterierten Endprodukten aus den entsprechenden deuterierten Anilinen ohne größere Schwierigkeiten möglich. Im Übrigen ergab die Synthese von methylsubstituierten Verbindungen nach Tischler schlechte Ausbeuten und viele Nebenprodukte.

Nach Yoneda lassen sich die Anilinouracile (5) sehr leicht durch Umsetzung in Substanz der entsprechenden Aniline (1 oder 4) mit einem reaktiven Derivat der Barbitursäure, dem 3-Methyl-6-chloruracil, darstellen (s. Abb. 14). Allerdings entsteht hier oft schon als Nebenprodukt Deazaflavin. Die Menge hängt kritisch von der Reaktionsdauer ab. Anzunehmen ist, daß das zusätzliche Kohlenstoffatom für die Position 5 von einer abgespaltenen Methylgruppe aus nicht umgesetztem Anilin stammt. Nähere Einzelheiten über diese Nebenreaktion sind nicht bekannt, da Deazaflavine besser über einen anderen Weg synthetisiert werden können /105/.

Die anschließende Nitrosierung des Anilinouracils in Essigsäure ergibt das N-Oxid des entsprechenden Flavins. Bereits hieraus lassen sich die entsprechenden Radikale durch Reduktion darstellen, man benötigt allerdings längere Zeit. Deswegen empfiehlt sich die Reduktion des N-Oxids und anschließende Reoxidation zur allein stabilen, oxidierten Stufe des Flavins. Die Reduktion dieser Verbindung führt schnell zu einer guten Radikalkonzentration (s. auch 3.2.3.1.).

Verschiedene Substituenten in Position 3 der Flavine erhält man durch die Umsetzung der 3-H-Verbindung mit dem entsprechenden Alkylhalogenid in Gegenwart einer Base /106/.

3.2.2. Thiaalloxazine und Thiaisoalloxazine

Diese Substanzklassen sind erst seit relativ kurzer Zeit bekannt. Bisher gibt es zwei Synthesewege zur Darstellung

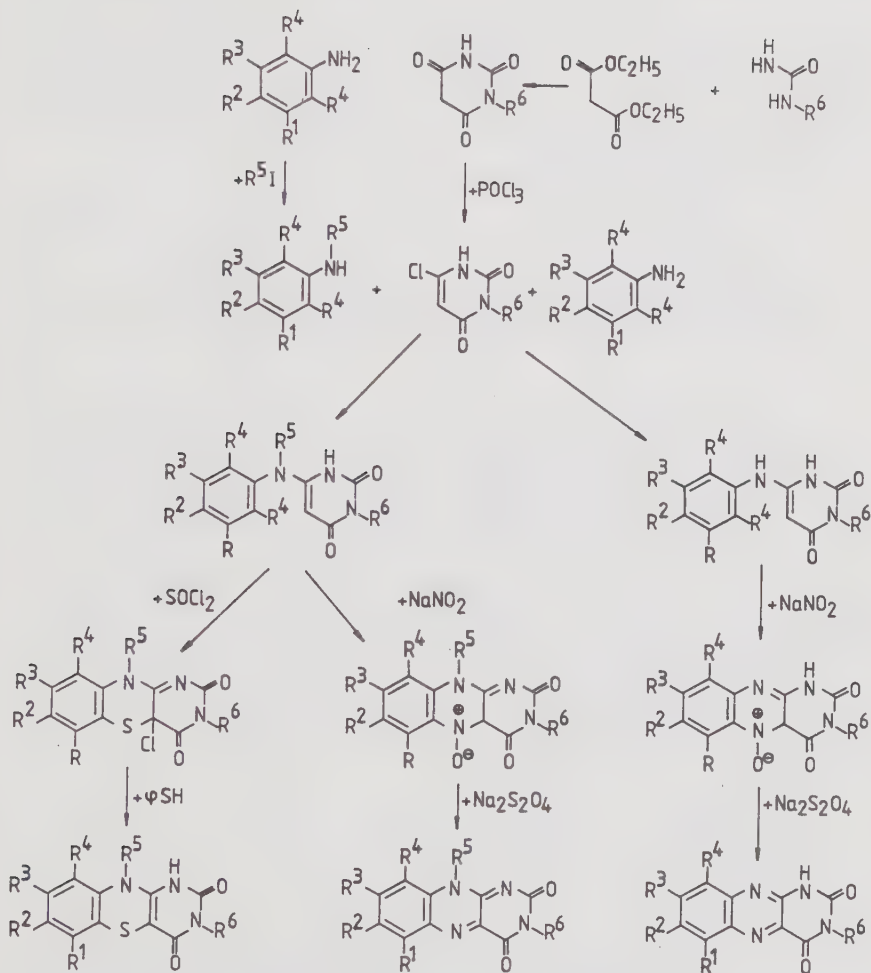
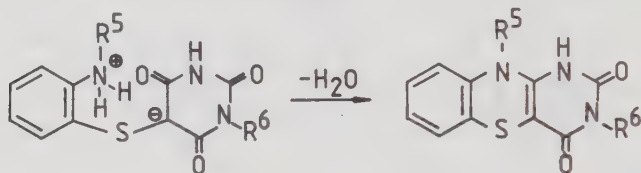


Abbildung 14. Syntheschema der Alloxazine, Isoalloxazine und der Thiaisoalloxazine aus den entsprechenden Vorstufen

dieser schwefelanalogen Flavine. Grauert koppelte eine 2-Amino-thiophenol-Komponente mit 5-Chlorbarbitursäure /107/. Eine Cyclisierung in äthanolischer Salzsäure ergibt das entsprechende Thiaflavin. Leider ist die Darstellung der Thiophenol-Verbindung und auch des Folgeproduktes nicht immer einfach, und die Bedingungen für die Reaktion ändern sich stark durch andere Substituenten in den Molekülen.



Besser verläuft die Cyclisierung des Anilinouracils mit Thionylchlorid oder Schwefeldichlorid (s. Abb. 14). Das entstandene 4a-Chlor-5-thiaflavin wird mit Hydrazin oder Thiophenol zum 5-Thiaflavin reduziert /59,108/.

Bei den cyclisierenden Reaktionen zu Flavinen und Thiaflavinen aus den Anilinouracilen sind verschiedene Isomere als Produkte möglich. Über die eindeutige Charakterisierung der gewonnenen Verbindungen und deren Isomere wird in Kapitel 3.3.1. im Rahmen der NMR-Untersuchungen ausführlich berichtet.

3.2.3. Radikalerzeugungsmethoden

3.2.3.1. Alloxazine und Isoalloxazine

Da diese Verbindungen nach der Synthese in ihrer stabilen oxidierten Form vorliegen, ist ein Reduktionsmittel zur Darstellung der Radikale erforderlich. Außer elementarem Wasserstoff /32/ bieten sich unedle Metalle wie Zink /34/ oder Zinn an, die in Säuren Wasserstoff bilden. In saurem Medium sind weiterhin Titantrichlorid /47/ und Natriumdithionit /21,30/ als Reduktionsmittel für Flavine bekannt.

Für die ENDOR-Messungen in flüssigen Lösungen werden die paramagnetischen Stufen in hochevakuierten Glasgefäßen herge-

stellt, so daß Wasserstoff produzierende Reduktionsmittel wie die Metalle in Säuren ausscheiden. Sie würden das Vakuum extrem verschlechtern und die Destillation des Lösungsmittels zur Variation der Radikalkonzentration unmöglich machen. Für Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb Natriumdithionit zur Reduktion gewählt.

Da die Neutralradikale der Flavine sauerstoffempfindlich sind, wird hier zu Darstellung der neutralen semichinoiden Stufe ein anderer Weg beschritten /31,109/. Nach Reduktion des Flavins zur Dihydro-Stufe wird in Position 5 alkyliert und durch Reoxidation das auch an Luft stabile Radikal erzeugt. Für Alloxazine ist bisher keine Methode zur Darstellung von Neutralradikalen bekannt.

Für die Anionradikale der Flavine kennt man bereits diverse Darstellungsmethoden. Zur Reduktion mit Wasserstoff in basischem Milieu /32/ oder zur Reaktion mit einer starken Base /110/ ist ein polares Lösungsmittel wie z. B. Dimethylformamid nötig. Infolge seiner starken Dämpfung von Mikrowellen und der ungünstigen Viskosität eignet es sich meist nicht für ENDOR-Experimente.

Hier bietet sich die elektrolytische Darstellung von Radikalen an. Die elektrochemische Reduktion der Flavine wurde bereits ausgiebig untersucht /111/. Allendoerfer baute diese Methode aus, so daß in Hexamethyl-phosphorsäureamid mit einem Leitsalz die Anionradikale einiger Flavin-Derivate erzeugt werden können /112/. Dies geschieht entweder im EPR-Resonator oder in einer externen Zelle nahe dem ENDOR-Resonator, so daß die spektroskopischen Experimente sofort nach der Elektrolyse erfolgen können. Auch hier gelang die Reduktion der Alloxazine nicht.

3.2.3.2. Thiaalloxazine und Thiaisoalloxazine

Von diesen Verbindungsklassen liegen die reduzierten Formen als Vorstufen der Radikale vor. Eine Oxidation ergibt in dem entsprechenden Milieu die Kation- (in Säure) oder Neutralradikale, während Anionradikale nicht bekannt sind. Als Oxi-

tionsmittel benutzt man Brom /58/, Dibenzoylperoxid und Schwefelsäure /113/. Die Methode von Forbes et al /114/ zur Darstellung von Kationradikalen in Nitromethan mit Aluminiumtrichlorid oder Schwefelsäure liefert teilweise andere Produkte /115/. Zumindest Verbindungen ohne Methylgruppe in Position 8 sind sehr reaktiv und ergeben mit AlCl_3 noch weitere Folgeprodukte. Im ENDOR-Experiment waren daher keine eindeutigen Ergebnisse zu erzielen. Einzig Dibenzoylperoxid ergibt gute Konzentrationen nur eines Radikals der Thiaflavine in den für die ENDOR-Spektroskopie günstigen Lösungsmittelgemischen Toluol/Trifluoressigsäure oder Methylenchlorid/Trifluoressigsäure.

Ohne Zusatz einer Säure sind Thiaflavine nur in Lösungsmitteln wie DMSO und DMF löslich, die ungeeignet für ENDOR-Untersuchungen sind. Auch ist die Konzentration der Verbindungen in Gemischen dieser Lösungsmittel mit Toluol gering, so daß die Oxidation der Lösung mit Bleidioxid zur Bildung der Thiaflavin-Neutralradikale wie bei den Phenothiazinen /116/ nicht sehr erfolgreich ist. Bessere Ergebnisse werden durch Ausnutzung eines Dimerisierungs-Gleichgewichts des Neutralradikals in Chloroform erzielt /58/. Die durch Neutralisierung der Kationradikale mit einer sterisch gehinderten Base synthetisierten Dimere der Neutralstufen ergeben in Chloroform eine ausreichende Konzentration der Neutralradikale für die ENDOR-Spektroskopie.

3.3. Spektroskopische Untersuchung der Verbindungen

3.3.1. NMR-Spektren

Zur Sicherung der Strukturen der Zwischenverbindungen und Endprodukte wurden Protonen-NMR-Spektren aufgenommen. Dies erschien insbesondere notwendig, um die Stellung der verschiedenen Methylsubstituenten im benzoiden Teil der Moleküle festzulegen. Für weitere Aussagen im Rahmen der EPR- und ENDOR-Untersuchungen ist dies von großer Wichtigkeit. In den Tabellen 7 bis 9 sind die chemischen Verschiebungen und meßbare Kopp-

lungen für die Anilinouracile und die Endverbindungen aufgelistet.

Die im Rahmen dieser und anderer Arbeiten /117/ hergestellten unterschiedlich substituierten und deuterierten Verbindungen ermöglichen durch Vergleiche ihrer NMR-Spektren einige Zuordnungen der Resonanzlinien zu Molekülpositionen.

Die Spektren von Anilinouracilen in Deuteriochloroform weisen vier Sorten von Protonensignalen auf (Tab. 7): Absorptionen für Methylprotonen im Bereich von 2 ppm bis 3,5 ppm, Aromatenprotonen im Bereich von 6,5 ppm bis 7,5 ppm, CH-Protonen um 4,9 ppm und NH-Protonen mit relativ breiten Signalen bei 8 ppm bis 10,5 ppm. Bei den Methylprotonenlinien lassen sich deutlich die der Methylgruppen an Stickstoffatomen (etwa 3,2 ppm) von denen der am benzoiden Molekülfragment gebundenen Methylgruppen (2,3 ppm) unterscheiden. Die Signale der Methylprotonen in Position 1' am Stickstoffkern sind noch um etwa 0,1 ppm gegenüber denen in Position 3 tieffeldverschoben. α -Protonen in Position 1' geben Anlaß zu Resonanzlinien bei etwa 10,5 ppm.

Gegenüber den entsprechenden Anilinouracilen fehlt bei den Isoalloxazinen und Alloxazinen eine Absorption bei etwa 5 ppm (s. Tab. 8). Diese ist oben dem Proton in Position 5 des Uracilteils zugeordnet worden. Nach der Cyclisierung zur Bildung des Endproduktes ist dieses Proton ebenso abgespalten, wie bei den Flavinen das Proton in Position 1 nun fehlt. Anhand der Abbildung 15 erkennt man, daß nach dem Ringschluß des Anilinouracils verschiedene Verbindungen entstehen können. So würde man eine Cyclisierung der Position 5 des Uracilteils mit der Position 2' oder 6' des Anilinteils erwarten. Aus dem 6-(3',4'-Dimethylanilino)-uracil könnten also sowohl 3,7,8-Trimethyl- als auch 3,6,7-Trimethyl-alloxazin entstehen. Die ^1H -NMR-Spektren sollten in diesen Fällen die Strukturen der Verbindungen erkennen lassen, da für die verschiedenen Isomeren unterschiedliche Kopplungsmuster der Aromatenprotonen zu erwarten sind.

Tabelle 7. Chemische Verschiebung (δ in ppm) und Kopplungskonstanten der Anilinoaracilprotonen, Lösungsmittel CDCl_3

Nr.	Methylprotonen				5	aromatische Prot.	NH(1)	N ¹ H	J (x,y) ^B
	3	3'(5')	4'	N'					
<u>5b</u>	3,07		2,30		4,77	7,09;7,19	8,18	10,5	9,8 (2',3')
<u>5c</u>	3,09	2,31			4,88	6,92;7,00;7,02;7,26	8,17	10,4	8,4 (5',4',6')
<u>5d</u>	3,07	2,27			4,87	6,69	8,13	10,4	
<u>5e</u> ^A	3,04	2,18	2,18		4,74	6,90;6,96	8,00	10,5	
<u>5f</u>	3,18		2,39	3,27	4,91	7,09;7,27	8,5		8,5 (2',3')
<u>5g</u>	3,19	2,38		3,24	4,92	6,98;7,01	8,0		8,0 (5',4',6')
<u>5i</u> ^A	3,18	2,30	2,30	3,26	4,92	6,91;6,99	8,4		

A₁ Literaturstelle /117/

B₁ Kopplungskonstanten der Protonen in den Positionen x und y in Hz

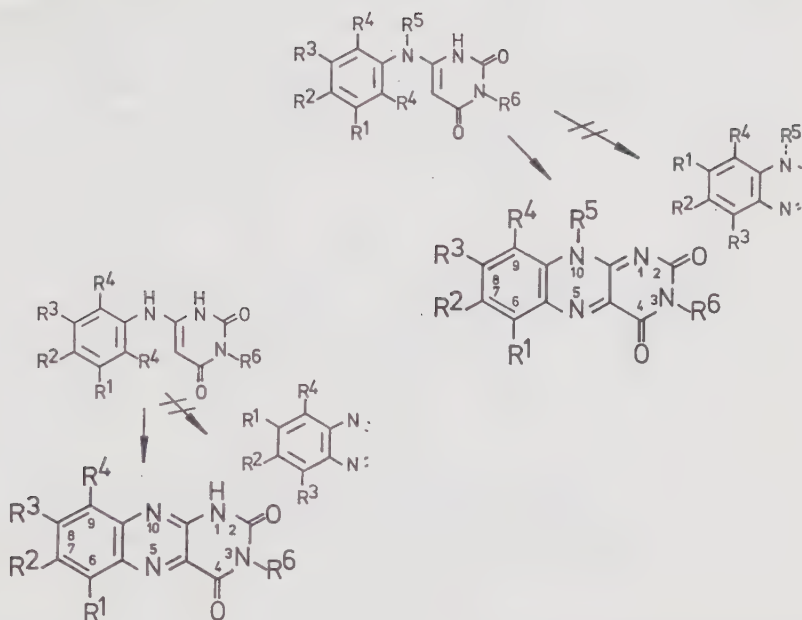


Abbildung 15. Mögliche Isomere der Alloxazine und Isoalloxazine nach ihrer Synthese aus den Anilinouracilen

Im Falle des 3,6,7-Trimethylalloxazins sind zwei Aromatenprotonen (Position 8 und 9) direkt benachbart, man sollte eine ortho-Kopplung von 8 Hz bis 10 Hz messen können. Beim 3,7,8-Trimethylalloxazin ist höchstens eine para-Kopplung der Protonen in Position 6 und 9 miteinander zu erwarten. Diese liegt im allgemeinen bei etwa 1 Hz und kann hier kaum noch aufgelöst werden. Abbildung 16 zeigt das Protonen-NMR-Spektrum des Cyclisierungsproduktes aus 6-(3',4'-Dimethylanilino)-uracil. Im Aromatenbereich sind zwei Absorptionssignale zu erkennen, die zwei Protonen zuzuordnen sind. Da keine meßbare Kopplung dieser beiden miteinander zu erkennen ist, liegt also das reine 3,7,8-Trimethylalloxazin vor. Eine mögliche Erklärung für das

ausschließlich entstandene Isomere ist ein sterischer Einfluß der Methylgruppe in Position 3' des Anilinteils auf die Reaktion an der benachbarten Position 2'. Ebenso konnten von allen anderen Isoalloxazinen und Alloxazinen, die ebenfalls Isomere erwarten lassen, nur die NMR-Spektren der hier angegebenen Strukturen erhalten werden.

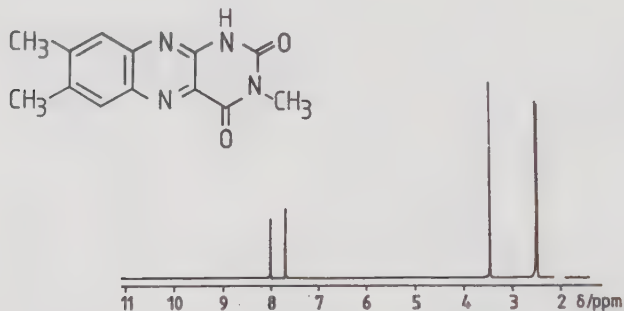


Abbildung 16. NMR-Spektrum von 6e in CDCl₃, Zuordnung s. Text

Weiterhin lassen sich bei den Alloxazinen und Isoalloxazinen Protonensignale für die Methylgruppen bei 3,1 ppm bis 3,8 ppm für die Position 3 und bei 3,2 ppm bis 4,2 ppm für die Position 10 erkennen. Die benzoiden Methylgruppen unterscheiden sich in ihren Absorptionen unwesentlich, die chemische Verschiebung nimmt in der Reihenfolge der Positionen 6, 8, 7 ab, was sich durch unterschiedliche Elektronenverteilung im Molekül erklären ließe. Ebenso verhalten sich die Werte für die entsprechenden benzoiden α -Protonen. Bei Werten von 12 ppm erscheint die Absorption für das 1-NH-Proton der Alloxazine.

Grande et al haben bereits NMR-Messungen dieser Verbindungen bei verschiedenen Polaritäten des Lösungsmittels durchgeführt /118/. Sie verwendeten deuteriertes Chloroform und Methanol in verschiedenen Mischungsverhältnissen. So stellten sie z. B. bei 7e eine Zunahme der chemischen Verschiebung der Protonensignale der Positionen 6 und 3 bzw. eine Abnahme für Position 9

Tabellen 8 und 9. Chemische Verschiebungen (δ in ppm) und Kopplungskonstanten der Protonen von Alloxazinen, Isoalloxazinen (in CDCl_3) sowie von Thiaisoalloxazinen ($\text{DMSO}-d_6$)

Nr.	Methylprotonen					aromat. Protonen					NH(1)	J (x,y) ^B
	3	6	7	8	10	6	7	8	9			
<u>6b</u>	3,76		2,80			8,26		8,19	8,19		11,89	
<u>6c</u>	3,73			2,81		8,33	8,00		7,98		11,82	8,8 (6,7)
<u>6d</u>	3,74	2,92		2,77			7,85		7,80		12,39	
<u>6e</u> ^A	3,51		2,52	2,55		8,04			7,73			
<u>7b</u>	3,50		2,55		4,12	8,10		7,76	7,58			8,8 (8,9)
<u>7c</u>	3,56			2,70	4,17	8,24	7,76		7,50			9,6 (6,7/
<u>7d</u>	3,53	2,20		2,16	4,13		7,34		7,30			
<u>7e</u> ^A	3,55		2,47	2,57	4,14	8,09			7,47			
<u>10c</u>	3,08			2,23	3,27	6,79	6,77		6,91			8,0 (6,7)
<u>10d</u>	3,10	2,16		2,20	3,27		6,61		6,71		11,17	
<u>10e</u> ^A	3,55		2,10	2,15	3,28	6,86			6,80		11,28	
<u>10v</u> ^A	3,11	2,22	2,12		3,30			6,98	6,72		11,30	9,0 (8,9)

^A Literaturstelle /117/

^B Kopplungskonstanten der Protonen in den Positionen x und y in Hz

mit abnehmender Polarität fest. Alle anderen Werte zeigen einen maximalen Wert bei einem Mischungsverhältnis von etwa 1:1. Extrapoliert man diese Ergebnisse auf reines CDCl_3 , so ergeben sich Werte, die den hier gemessenen gleichen.

Die Einführung eines Schwefelatoms in Position 5 bedeutet für die chemischen Verschiebungen der Protonen zum Teil drastische Änderungen. So werden alle Protonensignale zu höherem Feld verschoben und es tritt ein neues Signal bei etwa 11,2 ppm auf, das dem NH-Proton in Position 1 zuzuordnen ist (s. Tab. 9). Beim Vergleich der Thiaflavine mit den Flavinen muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Thiaanalogen in ihrem reduzierten Zustand gemessen werden, während Flavine in ihren oxidierten Stufen vorliegen. Die Reduktion des Flavins bedeutet im ^1H -NMR-Spektrum ebenfalls eine starke Verschiebung der meisten Protonensignale zu höherem Feld /18/. Die Erklärung hierfür ist eine stark erhöhte Elektronendichte im Molekül. Im Vergleich der Thiaflavin-Daten mit denen der reduzierten Flavine sind nunmehr keine größeren Unterschiede mehr festzustellen.

Für die Thiaflavine ist außerdem zu beobachten, daß teilweise durch NMR-Spektren unerwünschte Isomere nach der Cyclisierung gefunden werden können. So können die 10% des 3,6,7,10-Tetramethyl-thiaaisoalloxazins von 10g erst nach mehrmaligem Umkristallisieren im NMR-Experiment nicht mehr nachgewiesen werden. Im Falle des 7,8-Dimethyl-tetraacetyl-thiariboflavins zeigt das NMR-Spektrum (Abb. 17) sogar etwa 40% des anderen Isomeren, das selbst durch HPLC nicht abgetrennt werden kann.

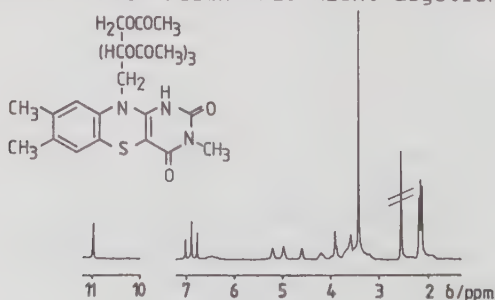


Abbildung 17. NMR-Spektrum von 10g in $\text{DMSO}-d_6$; drei Signale bei etwa 7 ppm deuten auf zwei Isomere hin

3.3.2. Massenspektren

Lumichrom 6e, Lumiflavin 7e und Riboflavin 7p wurden bereits von Brown et al massenspektrometrisch untersucht, und es wurden Fragmentierungswege sowie Strukturen von den entsprechenden Radikalkationen vorgeschlagen /119/. Sie beschreiben den Abbau der beiden Grundkörper Isoalloxazin und Alloxazin wie folgt:

Isoalloxazin

Auf die primäre Fragmentierung von CH_3NCO aus dem Molekülradikalion folgt eine Methylabspaltung (R^2 oder R^3 , s. Abb. 3). Das entstehende Fragmention soll unter Beteiligung des benzoiden Teils des Flavins und der verbleibenden Methylgruppe ein stabiles Siebenringsystem bilden, während R^5 erhalten bleibt. Die weitere Abspaltung von Kohlenmonoxid ergibt ein Radikalkation der Masse 170. Der folgende Abbau ist durch Eliminierung von Blausäure charakterisiert. Ein zweiter Abbauweg führt nach Decarbonylierung zu einem Radikalkation mit der Masse 228 (7e) oder 242 (7j). Nur 7e kann unter Deprotonierung ein Ion der Masse 241 bilden.

Alloxazin

Hier wird nur der erste Weg bis hin zum Siebenring vorgeschlagen.

Die für die vorliegende und andere Arbeiten synthetisierten Verbindungen erlauben es infolge ihrer Markierungen und der verschieden positionierten Methylgruppen, diese vorgeschlagenen Fragmentierungen zu überprüfen. In der Reihe der Isoalloxazine liegen die wichtigsten markierten und substituierten Verbindungen vor. Deshalb soll anhand der Ergebnisse ihrer Massenspektren der Nachweis der gesicherten Fragmentierungswege vorgenommen werden. Auf dieser Grundlage können die Abbauwege der Alloxazine, Thiaisoalloxazine und Deazaisoalloxazine diskutiert werden.

Abbildung 18 zeigt die Massenspektren von Lumiflavin 7e sowie der beiden deuterierten Verbindungen 7h und 7i. In Abb. 19 ist der unimolekulare Abbau des Molekülions und der wichtigsten Fragmentionen dargestellt. Unter unimolekularen Zerfällen versteht man hier die innerhalb der Laufzeit von ca. 10^{-5} sec

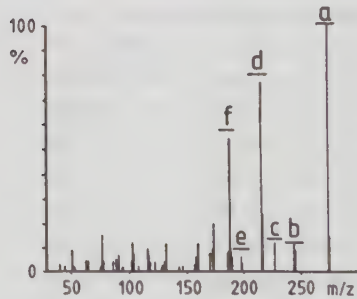
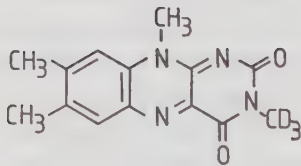
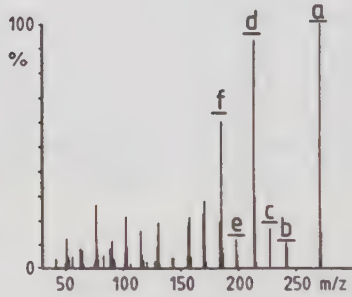
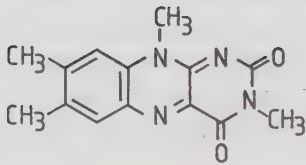
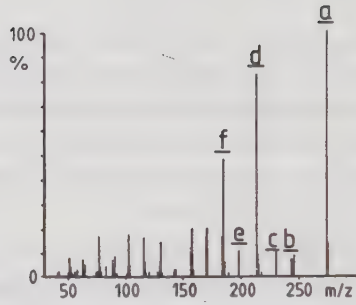
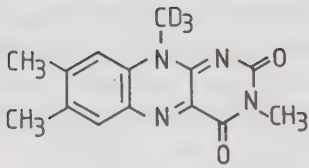


Abbildung 18. Massenspektren von 7e, 7h und 7i; die Buchstaben weisen auf Fragmentationen wie in Abb. 19 hin

außerhalb der Ionenquelle stattfindenden Fragmentierungen, durch geeignete Meßmethoden geben diese Zerfälle einen direkten Einblick in das Fragmentierungsverhalten von Molekül- und Fragmentionen, die Aussagen über die beteiligten Ionenstrukturen zulassen.

Aus dem Molekülion des Lumiflavins entsteht durch Decarboxylierung das Fragmention b (Abb. 18, 19) mit der Masse 242, das durch weitere Deprotonierung stabilisiert werden kann. Da hier nicht das markierte Kohlenstoffatom in Position 2 eliminiert wird, muß von einer bevorzugten Abspaltung der Carbonylgruppe in Position 4 ausgegangen werden. Im Falle einer Deuteromethylgruppe in Position 3 erfolgt die Eliminierung eines Deuterons aus dem Ion b. Man kann daher eine stabilisierende Ringerweiterung des Fünfringes annehmen, wobei eine CH_2 -Gruppe von Position 3 eingebaut wird, wie dies von N-Methylpyridinen bereits bekannt ist /120/. Aus diesem Ion wird eine Methylgruppe oder eine weitere Carbonylgruppe abgespalten. Die Zerfallsspektren der markierten Verbindungen belegen, daß es sich um die Methylgruppe der Position 10 (und nicht eine aus dem benzoiden Molekülteil) und die Carbonylgruppe in Position 2 handelt. Anschließend wird eine Verengung des ehemaligen Pyrimidinringes beobachtet.

Ein zweiter Fragmentierungsweg des Isoalloxazins beginnt mit der Abspaltung von CH_3NCO als stabilem Neutralteil. Durch verschiedene Markierung, so z. B. eines Carbonylkohlenstoffes, der beiden Stickstoffkerne im Pyrimidinring bzw. der Wasserstoffatome der Methylgruppe in Position 3 wird aus den Massenspektren deutlich, wie diese Eliminierung im Pyrimidinteil stattfindet. Wieder wird bevorzugt die Carbonylgruppe aus Position 4 eliminiert. Das entstehende Fragmention d kann als Vierring stabilisiert werden, aus dem CO ausschließlich aus Position 2 abgespalten wird. Die Struktur des Folgeproduktes f kann entweder als Drei- oder als Siebenring formuliert werden. Dieses Ion spaltet HCN bzw. ein Methylradikal ab.

Diese Ergebnisse wurden erstmals an spezifisch markierten Verbindungen gewonnen. Brown et al /119/ schlugen aufgrund der Messungen an unmarkierten Verbindungen Fragmentierungswege

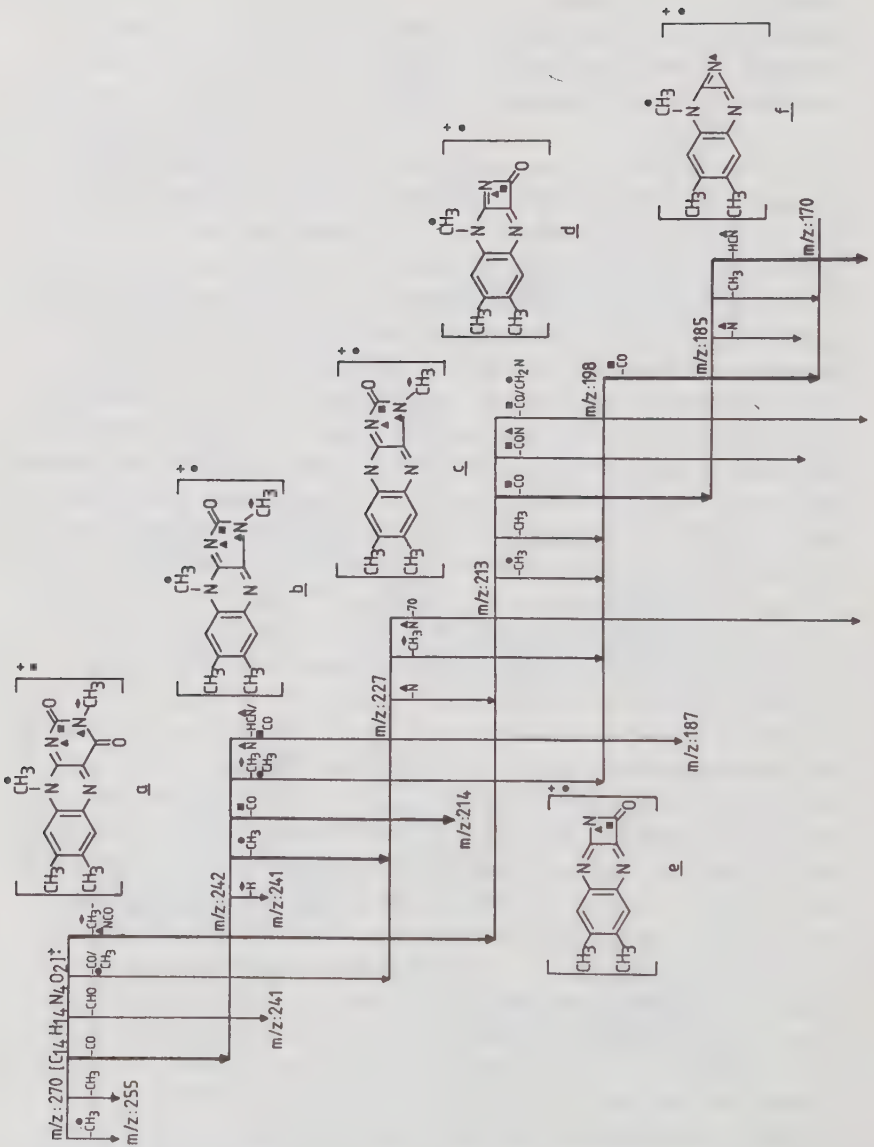


Abbildung 19. Fragmentierungsschema der Isoalloxazine mit den wichtigsten Fragmentationen

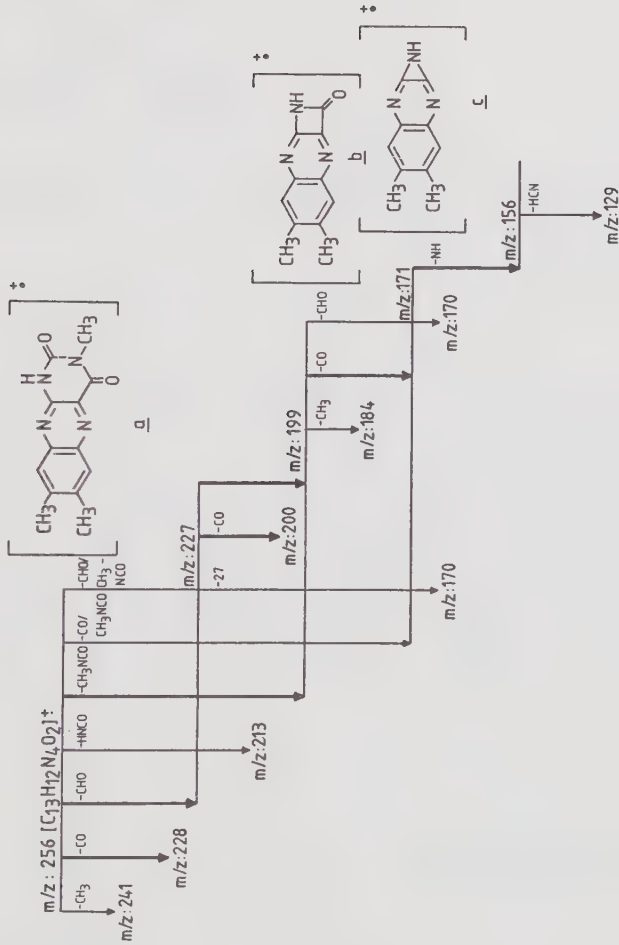


Abbildung 20. Fragmentierungsschema der Alloxazine

und Ionenstrukturen vor, die durch die Meßergebnisse der vorliegenden Arbeit eindeutig korrigiert werden müssen. So wird z. B. das Ion b nicht durch die Abspaltung einer Methylgruppe aus dem benzoiden Teil und nachfolgender Bildung eines Siebenringes stabilisiert. Wahrscheinlicher ist die Erweiterung des Pyrimidinteils bzw. bei kleineren Fragmentationen des Pyrazinringes. Ebenso ist eine offenkettige Struktur des Ions d nicht wahrscheinlich, da eindeutig die bevorzugte Abspaltung von CO aus Position 4 nachgewiesen ist. Zusätzlich konnte die stabilisierende Deprotonierung aus Position 3 des Ions b beobachtet werden.

Erwartungsgemäß werden die Alloxazine ähnlich fragmentiert, d. h. auch hier ist die bevorzugte Abspaltung einer Methylgruppe aus dem benzoiden Teil des Molekülions nicht festzustellen. Daher wird hier ein unimolekularer Abbau, wie in Abbildung 20 skizziert, vorgeschlagen.

Da die Verbindungen Thiaisoalloxazin und Deazaisoalloxazin massenspektrometrisch bislang noch nicht eingehender untersucht worden sind, sollen auch für diese Verbindungen Angaben über ihre strukturspezifischen Fragmentierungen gemacht werden. Bei den Thiaflavinen wurden dazu auch mehrere substituierte und deuterierte Verbindungen verwendet, die zur Sicherung der Abbauege herangezogen werden.

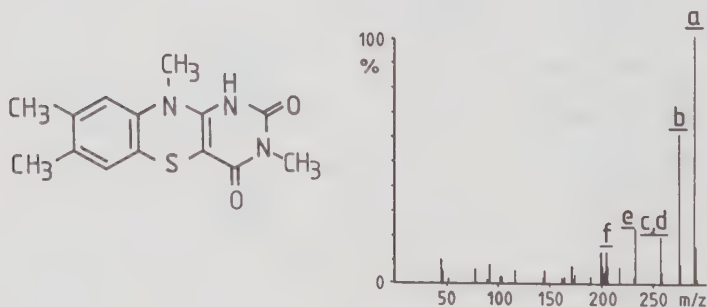


Abbildung 21a. Massenspektrum von 10e

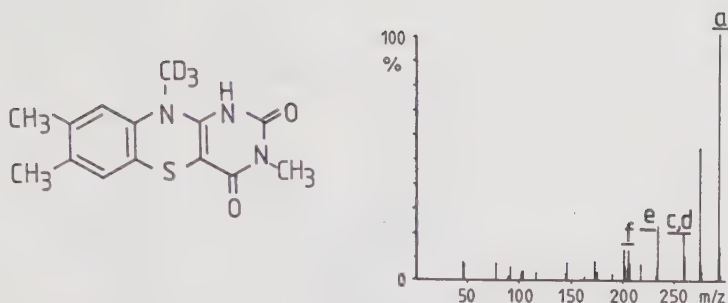


Abbildung 21b. Massenspektrum von 10h

Das Molekülion von 3,7,8,10-Tetramethyl-5-thiaisoalloxazin (s. Abb. 21a) zeigt drei Hauptfragmentierungen (Abb. 22). Das Massenspektrum der 10-CD₃-Verbindung belegt, daß die Methylgruppe in Position 10 bevorzugt eliminiert wird. Das entstandene Fragmention b spaltet anschließend CO oder CH₃NCO ab, wobei das Schwefelatom im Molekülgerüst verbleibt. Ebenso kann S/SH[•] aus dem Molekülion a abgespalten werden. Diese Zerfallsalternative ist von Phenothiazinen bekannt /121/. Nun ist die Bindung der Methylgruppe zu N-10 recht stabil, denn bevorzugt wird weiter CH₃NCO eliminiert. Eine Erweiterung des Fünfringes durch den Kohlenstoff der Methylgruppe in Position 10 zur Stabilisierung der Fragmentionen c oder d ist möglich. Als dritte Möglichkeit besteht der Abbau des Pyrimidinteils des Molekülions wie bei den Flavinen. Aus diesen Ergebnissen läßt sich eine starke Bindung der Methylgruppe in Position 10 zum Ringsystem der Fragmentionen c und d ableiten, nachdem das Schwefelatom eliminiert wurde.

Im weiteren soll kurz eine Interpretation des Massenspektrums eines Deazaflavins 14 (s. Abb. 24) vorgenommen werden. Da hier keine markierten Verbindungen vorliegen, kann nicht eindeutig nachgewiesen werden, von welchen Positionen des Molekülions Fragmente abgespalten werden. Signifikant ist die Decarbonylierung des Molekülions. Weiterhin ist der bevorzugte Abbau

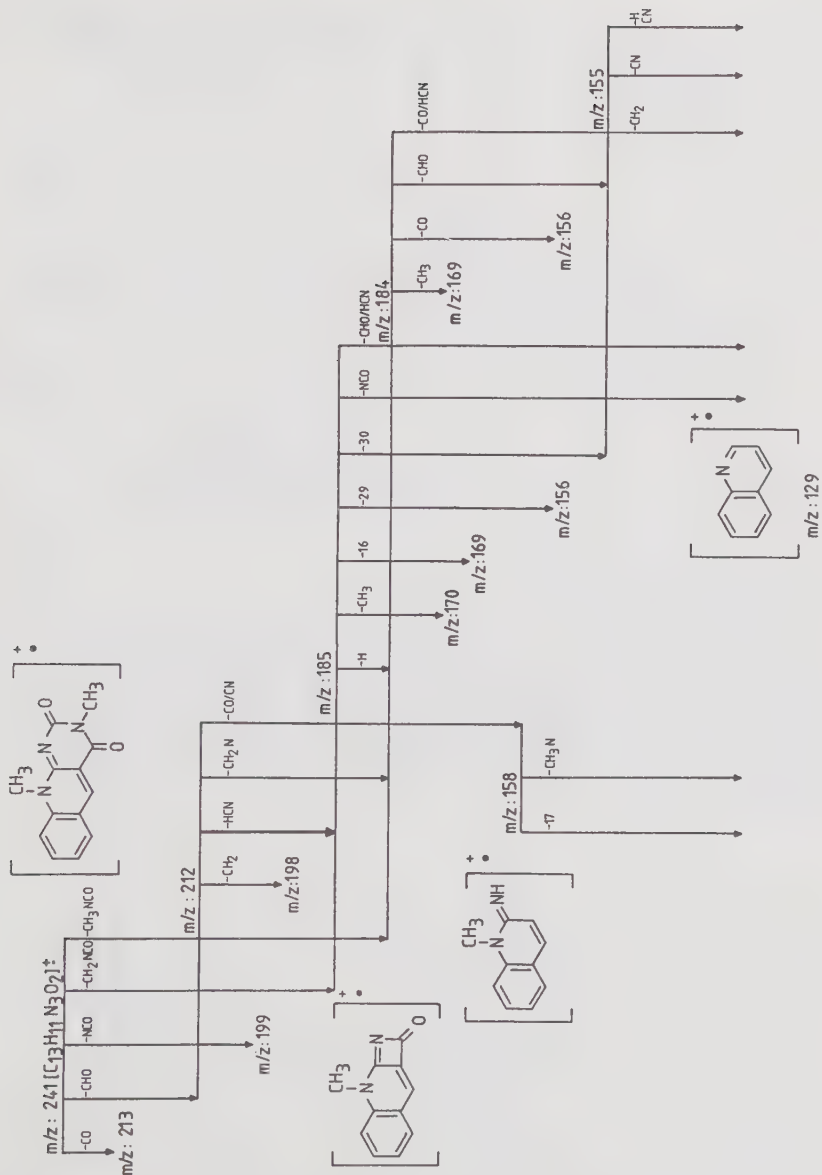


Abbildung 23. Fragmentierungsschema der Deazaalloxazine

des Pyrimidinteils zu beobachten. Anscheinend ist die Bindung zwischen N-10 und der Methylgruppe auch hier recht stabil, da erst in späteren Schritten eine Spaltung stattfindet (s. Abb. 23).

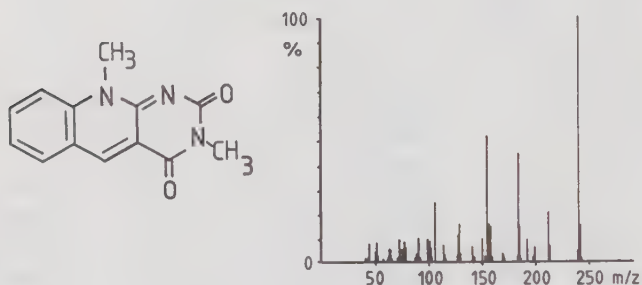


Abbildung 24. Massenspektrum von 14

Somit können die hier vorgeschlagenen Fragmentierungen der Isoalloxazine und Alloxazine nach der massenspektrometrischen Untersuchung ihrer markierten Verbindungen als gesichert gelten. Thia- und Deazaflavine müssen durch weitere Experimente an einigen markierten Substanzen noch eingehender untersucht werden.

3.3.3. EPR- und ENDOR-Spektren

Von allen im Substanzenschlüssel erwähnten Heterocyclen wurden teilweise erstmals die EPR- und ENDOR-Spektren der verschiedenen protonierten radikalischen Stufen aufgenommen, sofern eine Methode gefunden werden konnte, sie in einen stabilen paramagnetischen Zustand zu überführen. So kann hier schon erwähnt werden, daß 5-Deazaflavine nach keiner der bekannten Methoden stabile paramagnetische Spezies bildet. Es gibt auch bisher erst eine Arbeit, die sich mit der Untersuchung von 5-Deaza-Flavinradikalen beschäftigt /122/. Hier wird allerdings Puls-Radiolyse benutzt, die nur für extrem kurzlebige Radikale angewendet wird.

Die Güte der EPR- und ENDOR-Spektren bezüglich Auflösung und Linienbreite bzw. Linienintensität wurde durch Variation der Meßtemperatur, Konzentration der Radikale, EPR-Sättigung und RF-Leistung optimiert. Bis auf einige Ausnahmen handelt es sich bei ihnen um die ersten bekannten ENDOR-Lösungsspektren, so daß Vergleiche mit Literaturspektren sich meist auf die EPR-Ergebnisse beschränken müssen. Im folgenden werden diese Spektren, ihre Auswertung und eventuelle spezielle Messungen vorgestellt. Infolge der Vielzahl der Spektren ist es hier nicht möglich, alle abzubilden. Auf die Abbildung der meisten EPR- und General-TRIPLE-Spektren sowie einiger ENDOR-Spektren soll daher verzichtet werden.

Vor den Ergebnissen der EPR- und ENDOR-Spektroskopie an Flavinen und Thiaflavinen, die eigentliches Thema dieser Arbeit sind, sollen zum Vergleich die Spektren der Phenazin- und Phenothiazin-Radikale in dieses Kapitel aufgenommen werden. Dies dient der Sicherstellung der korrekten Radikaldarstellung, da von diesen mehr Vergleichsdaten vorhanden sind.

Zuerst sollen die Messungen der isotropen flüssigen Lösungen besprochen werden. Erst später werden die Meßergebnisse der gefrorenen Radikallösungen beschrieben, da für sie völlig andere Meßbedingungen und Auswertungsregeln gelten. Außerdem werden die Ergebnisse getrennt nach Stoffklassen diskutiert, so daß nicht jedes Spektrum einzeln beschrieben werden muß.

3.3.3.1. Isotrope flüssige Lösungen

Radikale der Grundkörper

Phenazinium-Radikale:

Aus dem Phenazin (11) läßt sich durch Reduktion ein Radikal erzeugen /123/. Für die im Rahmen dieser Arbeit nötigen Vergleiche wird wie für die Flavine (s. u.) das Lösungsmittelgemisch Toluol/Trifluoressigsäure benutzt, in dem das Radikal als zweifach protoniertes Anion, also als Kationradikal, vorliegt. Das Phenazinium-Kationradikal enthält nur drei Protonen- und eine Stickstoffsorte, was für ein einfaches EPR-Spektrum spricht. Das experimentelle EPR-Spektrum besteht auch aus sieben Hauptgruppen durch die Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit zwei Stickstoffatomen und zwei Protonen mit etwa gleichen Kopplungen. Die aromatischen α -Protonen sorgen für die weitere Aufspaltung einer Hauptlinie in 11 bis 13 Hyperfeinlinien (s. Abb 25).

Das ENDOR-Spektrum ergibt, wie erwartet, drei Protonen- und eine Stickstoffkopplung. Allerdings tauchen im tieffrequenten Teil Einstreuungen des EPR-Signals auf. Aus den General-TRIPLE-Spektren wurden die relativen Vorzeichen entnommen. Die absoluten Vorzeichen konnten nun so zugeordnet werden, daß die Kopplungen der Ringstickstoffkerne positives und die der NH-Protonen negatives Vorzeichen haben.

Das 5-Methyl-Phenazinium-Kationradikal 12^{•+} ist die paramagnetische Stufe eines Pharmazeutikums (Phenazinium-Methosulfat) /124/. Es besitzt nur noch eine Symmetrieachse, so daß sich hier mehr Kopplungen ergeben sollten. Das EPR-Spektrum des wie oben dargestellten Radikals zeigt nun neun Hauptgruppen, deren Randlinien ineinander übergehen. Sie lassen sich durch die Wechselwirkung des Elektrons mit zwei Stickstoffatomen und vier Protonen mit gleichen Kopplungen erklären. Die weitere Hyperfeinaufspaltung läßt sich ohne weiteres nicht mehr auswerten. Durch zwei weitere Protonen mit großen Kopplungen ist die Gesamtaufspaltung des Spektrums allerdings größer als die des Phenazinium-Kationradikals 11^{•+}.

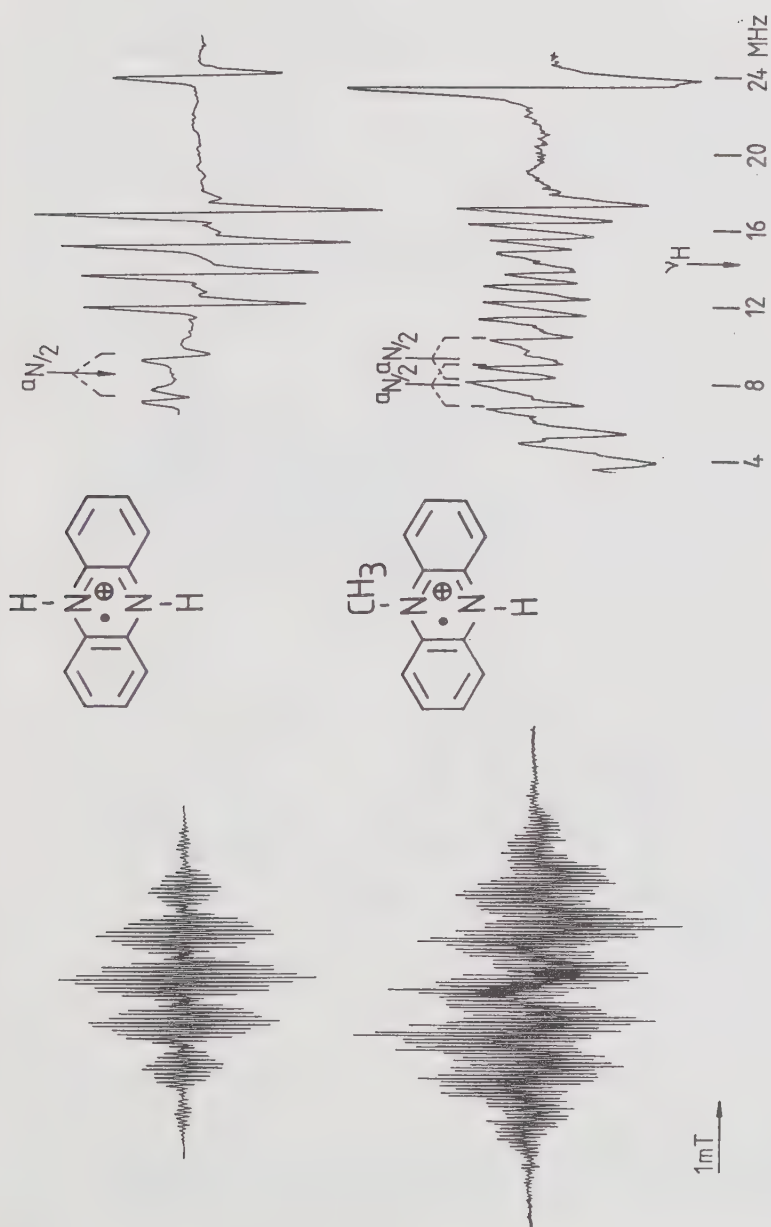


Abbildung 25. EPR- und ENDOR-Spektren von 11^{•+} und 12^{•+} in Toluol/Trifluoressigsäure bei 260 K, RF-Leistung = 100 mW, RF-Leistung = 100 W (14 MHz)

Aus den Mehrfachresonanz-Experimenten ergeben sich sechs Protonen- und zwei Stickstoffkopplungen mit ihren relativen Vorzeichen (s. Abb. 25). Die α - und β -Protonen an den Stickstoffatomen zeigen unterschiedlich intensive Signale und auch unterschiedliche relative Vorzeichen. Aufgrund der Relaxationstheorien lassen sich die intensiveren Linien den Kopplungen der Methylgruppen-Protonen zuordnen (s. auch Diskussion). Die positiven Vorzeichen dieser HFSCs bestätigen die Zuordnung (s. Tab. 10). Zusätzlich gemessene Kopplungen können den benzenoiden α -Protonen nur in Analogie zu Literaturdaten zugeordnet werden. Dies wurde bisher nicht durch Messungen markierter Verbindungen überprüft. In der Literatur konnten daher nur die Ergebnisse von theoretischen Rechnungen als Zuordnungsg Grundlagen herangezogen werden. Man erkennt, daß die Werte aus den ENDOR-Spektren mit denen der Literatur recht gut übereinstimmen /124-126/.

Tabelle 10. Isotrope Kopplungskonstanten der Phenazinium-Kationradikale, [MHz] $\pm$ 0,02 MHz

Nr.	a_1^H	a_2^H	a_3^H	a_4^H	a_9^N	$a_{9\alpha/\beta}^H$	a_{10}^N	$a_{10\alpha}^H$
<u>11^{•+}</u>	-1,56	-4,86	-4,86	-1,56	+17,13	-18,99	+17,13	-18,99 ^A
	1,85	4,79	4,79	1,85	18,19	17,21	18,19	17,21 ^B
	2,41	3,76	3,76	2,41	18,02		18,02	^C
	1,85	4,79	4,79	1,85	17,15	18,19	17,15	18,19 ^D
<u>12^{•+}</u>	-2,37	-5,69	-4,04	-1,12	16,63	+17,93	19,42	-18,57 ^A

A diese Arbeit, ENDOR in Toluol/ CF_3COOH , 260 K

B Literaturstelle /124/

C Literaturstelle /125/, berechnet nach McLachlan

D Literaturstelle /126/

Phenothiazin-Radikale:

Das EPR-Spektrum des Phenothiazin-Kationradikals 13a^{•+} zeigt kaum auswertbare Linienstrukturen. Die Doppelresonanz

ergibt vier Protonen- und eine Stickstoffkopplung, obwohl aufgrund der Molekülsymmetrie fünf Protonen-HFSCs zu erwarten sind (s. Abb. 27). Das General-TRIPLE-Spektrum zeigt allerdings, daß die Linien bei 15,4 MHz und bei 14,1 MHz von zwei Protonenkopplungen gleichen Betrages, aber mit unterschiedlichen Vorzeichen herrühren müssen. Da ihre Signalamplituden in diesem Experiment durch das positive Vorzeichen der einen Kopplung größer und durch das negative der anderen HFSC kleiner werden müßten, ist als Summe keine Reaktion auf die Einstrahlung der zweiten RF-Frequenz im General-TRIPLE-Experiment zu erkennen.

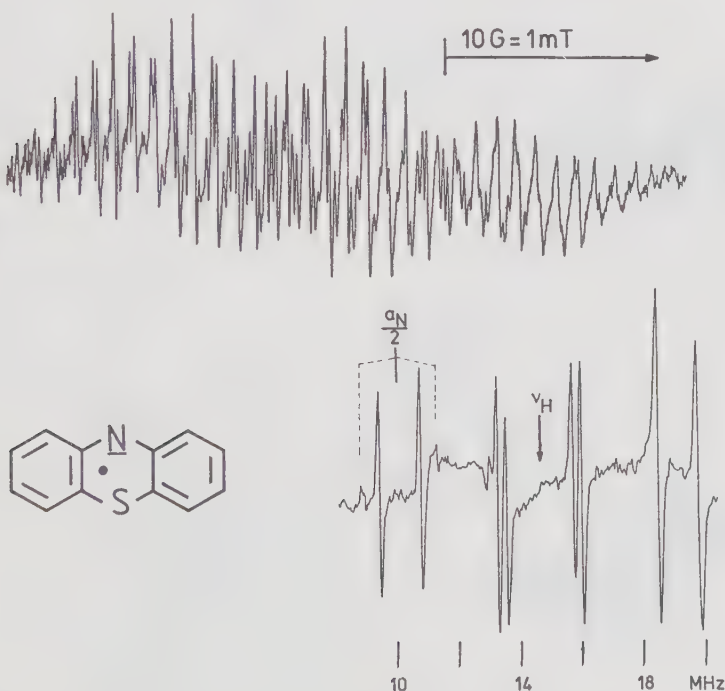


Abbildung 26. EPR- und ENDOR-Spektrum des Phenothiazin-Neutralradikals in Toluol bei 190 K bzw. 240 K

Das entsprechende Phenothiazin-Neutralradikal in Toluol, das ein vollständig analysierbares EPR-Spektrum gibt, läßt sich gut

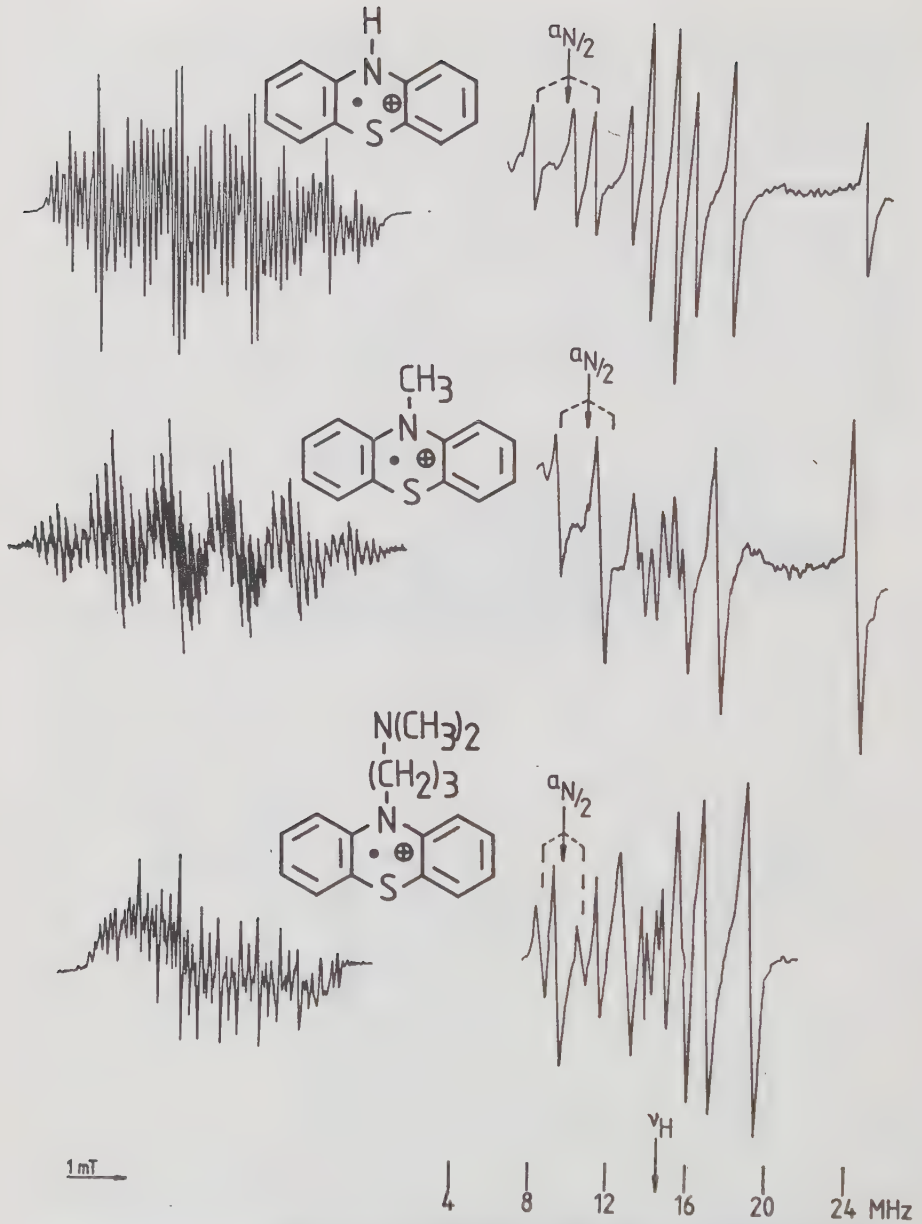


Abbildung 27. EPR- und ENDOR-Spektren der Phenothiazin-Kationradikale in Toluol/ CF_3COOH bei 260 K

mit den Mehrfachresonanz-Experimenten untersuchen (s. Abb. 26). Es gibt auch bereits eine ENDOR-Arbeit über das Phenothiazin-Neutralradikal von Kennedy und Dalal /127/. Die leicht unterschiedlichen Ergebnisse auch aus einigen EPR-Untersuchungen der Literatur /125,127,128/ lassen sich durch unterschiedliche Lösungsmittel erklären.

Im Falle des N-Methyl-Phenothiazin-Kationradikals 13b^{•+} erkennt man bereits im EPR-Spektrum sechs Hauptgruppen aufgrund einer Stickstoff- und einer Protonenkopplung von drei Wasserstoffatomen. Die vier Protonen-HFSCs und eine Stickstoff-HFSC aus dem ENDOR-Spektrum deuten wieder darauf hin, daß zwei Protonenkopplungen gleich sein müssen. Der Vergleich mit EPR-Daten der Literatur /125/ zeigt ebenfalls Unterschiede, die wieder mit den Eigenschaften verschiedener Lösungsmittel zu erklären sind. Auf jeden Fall kann angenommen werden, daß die Kopplung von etwa 2 MHz von zwei Protonensorten stammt.

In der Pharmazie ist bekannt, daß Phenothiazine mit Aminoalkylgruppen in Position 10 als hervorragende Neuroleptika fungieren können /129/. Über die Wirkungsweise ist bisher wenig bekannt, man nimmt allerdings eine radikalische Zwischenstufe bei der biologischen Wirkung dieser Verbindungen an /130/. Das Promazin 13c ist ein Vertreter dieser Medikamentenreihe. Das EPR-Spektrum von 13c^{•+} ist unaufgelöst und nicht ohne weitere Hilfsmittel auszuwerten, aber durchaus mit dem der Literatur /131/ vergleichbar.

Das ENDOR-Experiment liefert sechs Protonen- und eine Stickstoffkopplung, die leichte Abweichungen von denen der Literatur zeigen (s. Abb. 27). Anscheinend konnte hier sogar eine γ -Kopplung von +0,38 MHz gemessen werden, die in EPR-Experimenten nicht mehr aufgelöst werden kann. Eine Inäquivalenz der beiden β -Protonen des Substituenten in Position 10, wie beim Alimemazin-Kationradikal 13d^{•+} gemessen wurde /132/, kann hier nicht beobachtet werden (s. Diskussion).

Die Zuordnung der hier gemessenen α -Protonen-Kopplungen zu Molekülpositionen muß analog den EPR-Daten der Literatur vorgenommen werden (s. Tab. 11). Die großen positiven HFS-Werte jedoch stammen sicherlich von den Kopplungen der β -Protonen

Tabelle 11. Isotrope Kopplungskonstanten der Phenothiazin-Radikale, [MHz]: $\pm 0,02$ MHz

Nr.	a_1^H	a_2^H	a_3^H	a_4^H	a_{1U}^N	$a_{10\alpha/\beta}^H$	$a_{10\gamma}^H$
<u>13a^{•+}</u>	-3,32	1,30	-7,14	1,30	+18,03	-20,70 ^A	
	3,20	1,37	7,01	1,37	17,97	20,77 ^B	
	-4,04	-1,15	-6,08	+1,18	19,03	^C	
	3,17	1,40	7,01	1,40	17,77	20,43 ^D	
	3,47	1,29	7,26	1,29	18,22	21,02 ^E	
<u>13a[•]</u>	-10,45	+2,16	-7,76	+2,76	+19,92	^F	
	-10,53	+2,35	-7,92	+2,81	+19,85	^G	
	10,06	2,69	7,29	1,82	19,96	^H	
	10,26	2,66	7,99	2,66	19,76	^I	
<u>13b^{•+}</u>	-2,35	-2,35	-5,85	+0,48	+20,78	+19,80 ^A	
	2,80	2,13	6,17	0,81	21,02	20,27 ^J	
	-3,14	-1,43	-5,35	+0,95	20,69	^K	
<u>13c^{•+}</u>	-2,62	-2,20	-5,61	-1,22	+19,89	+9,98	+0,38 ^A
	2,94	1,40	5,61	1,40	19,48	10,04	^L
<u>13d^{•+}</u>	2,92	2,69	5,49	0,79	18,85	5,27/ 15,47	^M

^A Diese Arbeit, ENDOR in Toluol/CF₃COOH, 260 K

^B Literaturstelle /125/, EPR in H₂SO₄/Nitromethan

^C Literaturstelle /125/, berechnet nach McLachlan

^D Literaturstelle /128/, EPR in Nitromethan

^E Literaturstelle /128/, EPR in Acetonitril/H₂SO₄

^F Diese Arbeit, ENDOR in Toluol, 190 K, 240 K für a_9^N

^G Literaturstelle /127/, ENDOR in Mineralöl

^H Literaturstelle /128/, EPR in Acetonitril/Wasser

^I Literaturstelle /128/, EPR in Benzol

^J Literaturstelle /125/, EPR in Nitromethan/H₂SO₄

^K Literaturstelle /125/, berechnet nach McLachlan

^L Literaturstelle /131/, EPR in Benzol

^M Literaturstelle /132/, EPR in H₂SO₄

des Substituenten in Position 10. Erst nach einem erfolgreichen direkten Nachweis der Zuordnungen durch Messungen der deuterierten Verbindungen können alle Werte als gesichert gelten.

Alloxazin-Radikale

EPR-Spektren der folgenden Alloxazin- und auch der Isoalloxazin-Radikale sind relativ unaufgelöst und zeigen teilweise eine "asymmetrische Verformung", d. h. die Hochfeldlinien sind aufgrund der großen Anisotropie der Stickstoffkerne breiter als die Tieffeldlinien. Eine für ENDOR-Messungen optimale Mikrowellensättigung konnte unter diesen apparativen Bedingungen noch nicht bei der maximal zur Verfügung stehenden MW-Leistung von 200 mW erreicht werden. Ebenso mußte die RF-Leistung für intensitätsstarke Signale auf die maximal möglichen Werte eingestellt werden (100 bis 150 W bei 14 MHz).

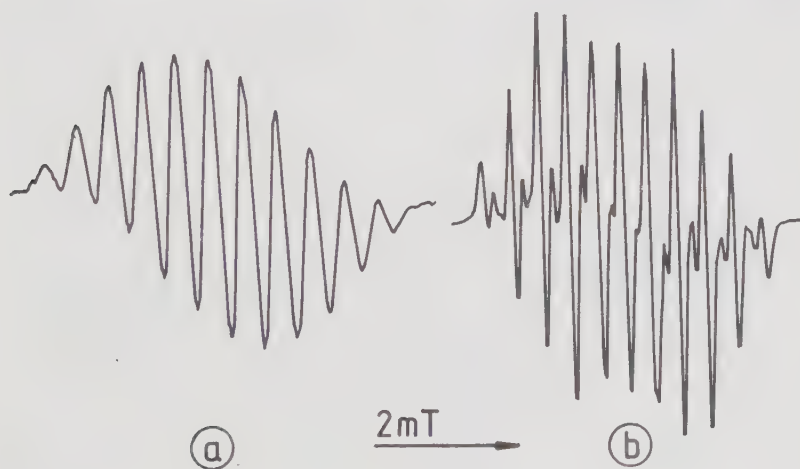


Abbildung 28. EPR-Spektren des Lumichrom- und des Alloxazin-Kationradikals $6e^{•+}$ (a) und $6a^{•+}$ (b) in Toluol/ CF_3COOH bei 300 K

Von den Alloxazinen konnten nur die Kationradikale durch Reduktion ihrer Ausgangsverbindungen gewonnen werden. Es gelang nicht, Neutral- und Anionradikale zu erzeugen, die aber auch nicht literaturbekannt sind. In den EPR-Spektren der Alloxazin-Kationradikale erkennt man zwischen 10 und 13 Linien, die kaum strukturiert sind (Abb. 28a). Interessanterweise ist das Bild der Spektren sofort verändert, wenn in Position 8 die Methylgruppe durch ein Proton ersetzt wurde, wie z. B. beim Alloxazin-Kationradikal 6a^{•+} (Abb. 28b).

In den ENDOR-Spektren (Abb. 29 und 30) kann man fünf bis sechs Protonen- und zwei Stickstoffkopplungen erkennen (Tab. 12). Eine Protonenkopplung fällt eindeutig weg, wenn die Positionen 6 und 9 deuteriert sind, während die alleinige Deuterierung von Position 9 keine Änderung im Habitus des ENDOR-Spektrums bringt (Abb. 29). Damit ist entgegen der Meinung anderer Autoren /26/ eine Spindichte in Position 9 nicht meßbar und die Kopplungskonstante von 1,3 MHz einer anderen Position zuzuordnen. Aus dem Vergleich mit anders methylsubstituierten Alloxazinradikalen geht hervor, daß diese Kopplung nur zu den Protonen in Position 3 gehören kann (Abb. 30). Leider kann durch nachträgliche Alkylierung eines Alloxazins nur die 1,3-Dialkylverbindung erhalten werden, bei der die Zuordnung der kleinen Kopplungen anscheinend etwas anders vorgenommen werden muß. Somit konnte der eindeutige Nachweis für diese Zuordnung durch Einführung einer Deuteromethyl-Gruppe in Position 3 nicht erfolgen; bei den Flavin-Kationradikalen jedoch wird dies nachgeholt. Die restlichen Kopplungskonstanten sind den anderen Protonen und Stickstoffatomen eindeutig analog den EPR-Daten der Literatur zuzuordnen, wie auch die Änderung von Vorzeichen der HFSCs nach Substitution eines Protons durch eine Methylgruppe zeigt. Natürlich kann man bei Messungen in Deuterotrifluoressigsäure/Toluol die beiden größten Protonenkopplungen für die Positionen 5 und 10 nicht mehr messen, aber im Deuteriumbereich treten entsprechende Linien auf. Die tieffrequenten Deuteriumlinien können aus technischen Gründen ebensowenig nachgewiesen werden wie die Signale für besonders kleine Deuteriumkopplungen (z. B. Position 6). Die größere Stickstoff-HFSC wird nur bei

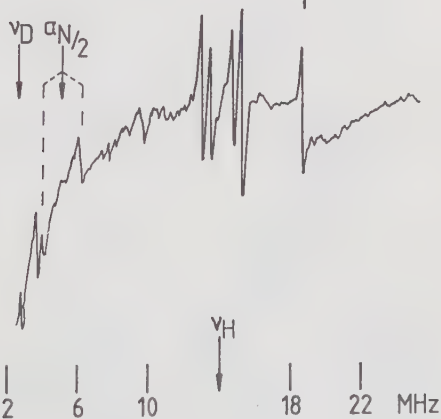
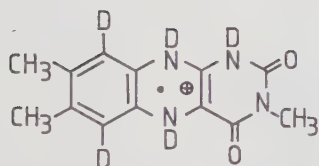
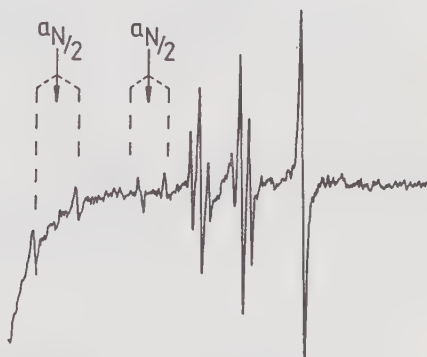
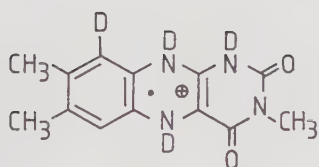
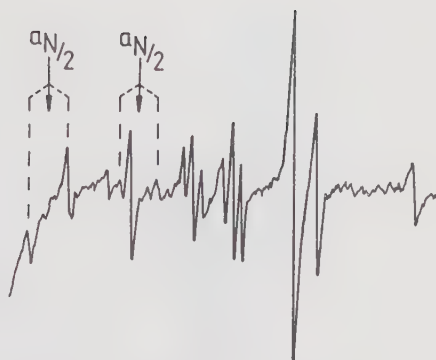
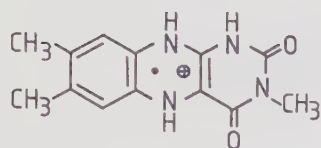


Abbildung 29. ENDOR-Spektren der Kationradikale $6e^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH und $6f^{\bullet+}$ sowie $6g^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH bei 260 K

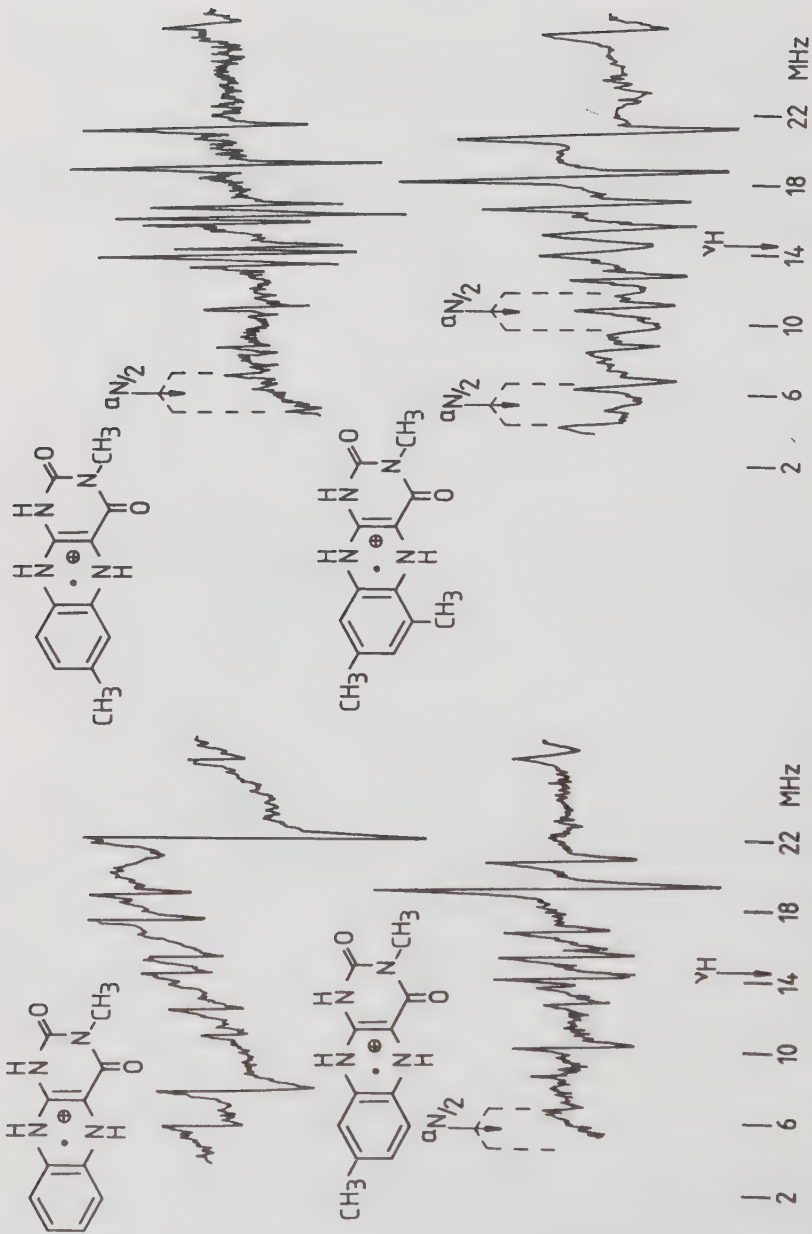


Abbildung 30. ENDOR-Spektren der Kationradikale 6a^{•+}, 6b^{•+}, 6c^{•+} und 6d^{•+} in Toluol/CF₃COOH bei 260 K

einigen Proben und bei höheren Temperaturen beobachtet.

In der Literatur /26/ sind zwar Kopplungen der Alloxazin-Kationradikale aus EPR-Spektren bekannt, stimmen aber nur größenordnungsmäßig mit den hier erhaltenen überein. Verantwortlich für Differenzen dürften andere Lösungsmittel und besonders die Methylsubstitution der Moleküle in Position 1 und 3 sein, was, wie oben bereits beschrieben, zu größeren Änderungen führt.

Tabelle 12. Isotrope Kopplungskonstanten der Alloxazin-Kationradikale, [MHz] $\pm$ 0,02 MHz

Nr.	a_3^H	a_5^N	a_5^H	a_6^H	a_7^H	a_8^H	a_{10}^N	$a_{10\alpha}^H$
<u>6a^{•+}</u>		21,46	23,62	4,13	1,27	7,43	11,23	12,07 ^A
	1,51	21,36	22,87	4,26	1,12	7,04	11,27	11,44 ^B
<u>6b^{•+}</u>		21,01	22,75	3,30	1,87	7,64	11,41	11,95 ^A
<u>6c^{•+}</u>	+1,23	21,44	-23,43	-4,03	2,09	+8,92	11,07	-11,94 ^A
<u>6d^{•+}</u>	+1,18	21,33	22,82	+1,85	-2,14	+8,75	11,21	-12,25 ^A
<u>6e^{•+}</u>	-1,25	21,22	-23,18	-3,31	+2,35	+9,36	+11,06	-11,93 ^A
<u>6f^{•+}</u>	1,25	20,99	3,70 ^C	3,30	2,33	9,20	11,05	2,00 ^C
<u>6g^{•+}</u>	1,29		3,70 ^C	-	2,34	9,10	11,05	2,00 ^C

^A Diese Arbeit, ENDOR in Toluol/CF₃COOH, 260 K, 280 K für a_5^N , teilweise konnten Vorzeichen und a_5^N nicht gemessen werden

^B Literaturstelle /26/, EPR in Acetonitril/HCl

^C Diese Arbeit, ENDOR in Toluol-d₈/CF₃COOD, a_5^H und a_{10}^H sind Deuteriumkopplungen

Isoalloxazin-Radikale

Lumiflavine:

Die einfachsten Modellmoleküle der Flavoenzyme sind Isoalloxazine. Lumiflavine enthalten in Position 10 eine Methylgruppe. Von ihnen konnten die EPR- und erstmals auch die ENDOR-Spektren der flüssigen Lösungen aller drei protonierten Formen, den Anion-, Neutral- und Kationradikalen, unter bestimmten experimentellen Bedingungen aufgenommen werden. Die EPR-Spektren eines Kationradikals (s. Abb. 31a) in Trifluoressigsäure/Toluol

und auch in anderen Lösungsmittelgemischen weisen zwischen 15 und 18 breite Linien auf, die je nach Konzentration der Probe auch zu einer "Einhüllenden" zusammenschmelzen können.

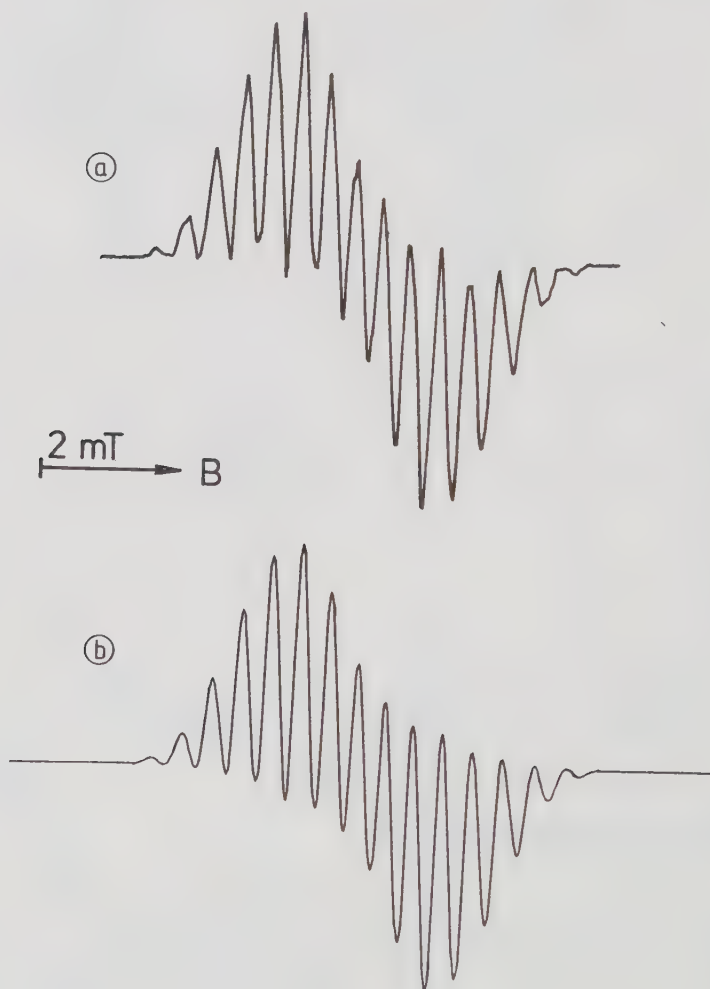


Abbildung 31. EPR-Spektrum und EPR-Simulation mit den ENDOR-Daten des Lumiflavin-Kationradikals $7e^{+\bullet}$ in Toluol/ CF_3COOH bei 260 K

ENDOR

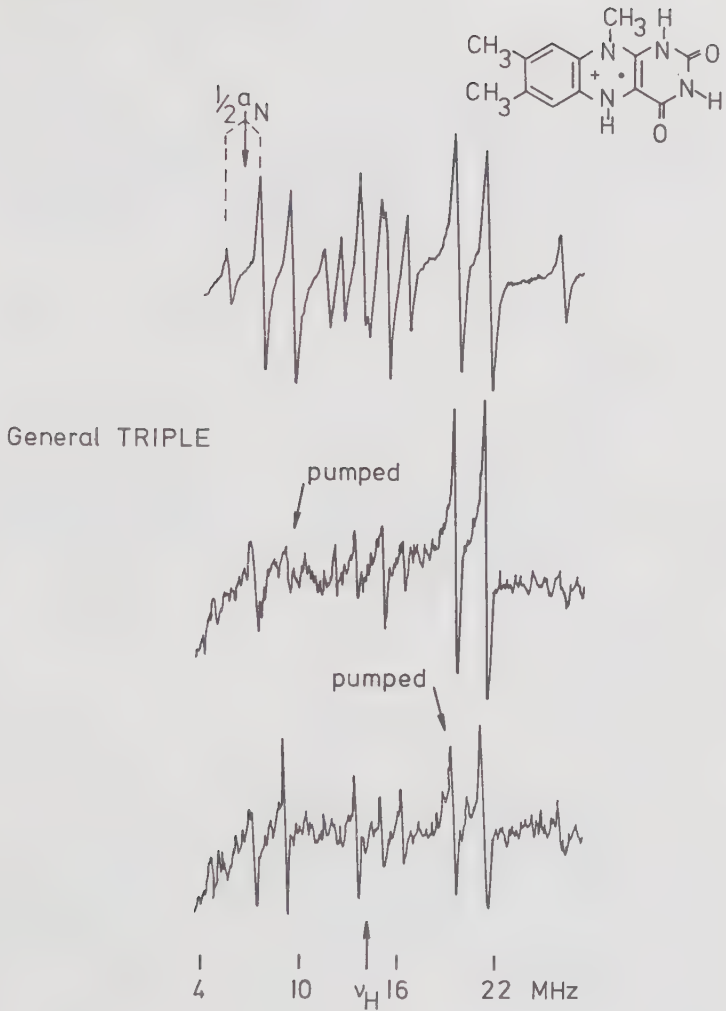


Abbildung 32. ENDOR- und General-TRIPLE-Spektren von $7e^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH bei 260 K

Die ENDOR-Daten der verschiedenen Lumiflavin-Kationradikale bestehen aus 5 bis 6 Protonen- und 2 Stickstoffkopplungen (s. Tab. 13). Manchmal überlagern sich Protonen- und Stickstofflinien wie z. B. in Abbildung 32. Die größte Stickstoffkopplung läßt sich nur bei etwa 300 bis 310 K nachweisen. In deuterierten Lösungsmitteln fehlt die größte Protonen-HFSC (Abb. 33), und man erhält eine Linie im Deuteriumbereich für das Deuteron in Position 5; die tieffrequente Deuteriumlinie konnte nicht detektiert werden. Ebenso lassen sich analog den Alloxazinradikalen nach Deuterierung der Position 6 ($7g^{*+}$) und auch der Position 3 ($7h^{*+}$) oder Position 10 ($7i^{*+}$) die entsprechende Protonenkopplungen nicht mehr nachweisen, während im letzten Falle noch eine hochfrequente Deuteriumlinie registriert werden kann (Abb. 33). Die Zuordnung der Kopplung von 0,9 MHz zur Position 3 und nicht zur Position 9 ist entgegen den Angaben von Müller et al /26/ also durch direkte Deuterierung nachgewiesen. Der Vergleich der verschiedenen methylsubstituierten Lumiflavin-Kationradikale läßt die weitere Zuordnung von Methylprotonen-Kopplungen zu den Positionen 7 und 8 zu (Abb. 34).

Erst Müller et al gelang es, detaillierte HFS-Daten aus computerausgewerteten EPR-Spektren zu erhalten /26/. Sie zeigen kaum Abweichungen von den hier gemessenen ENDOR-Werten. Die Zuordnung einer kleinen Kopplung von etwa 1 MHz zu Position 9 war allerdings falsch. Sie muß nun eindeutig den Methylprotonen in Position 3 zugeschrieben werden, während in Position 9 des Kationradikals keine Spindichte gemessen werden kann. Die Simulation des EPR-Spektrums des Lumiflavin-Kationradikals $7e^{*+}$ mit den ENDOR-Daten zeigt allerdings, daß die kleinen Kopplungen unter 2 MHz auf den Habitus des EPR-Spektrums keinen Einfluß haben (s. Abb. 31b).

Die Zuordnung der Kopplungen zu Molekülpositionen läßt sich außerdem durch Vergleich der Intensitäten der Linien im hochfrequenten ENDOR-Bereich durchführen. Da bei Frequenzen oberhalb von 10 MHz die RF-Leistung in etwa konstant bleibt, geben die Intensitäten der Linien größerer Kopplungen außer der Anzahl der Protonen besonders die Effizienz ihrer Relaxationswege wieder. Linien kleinerer Kopplungen unterliegen dem soge-

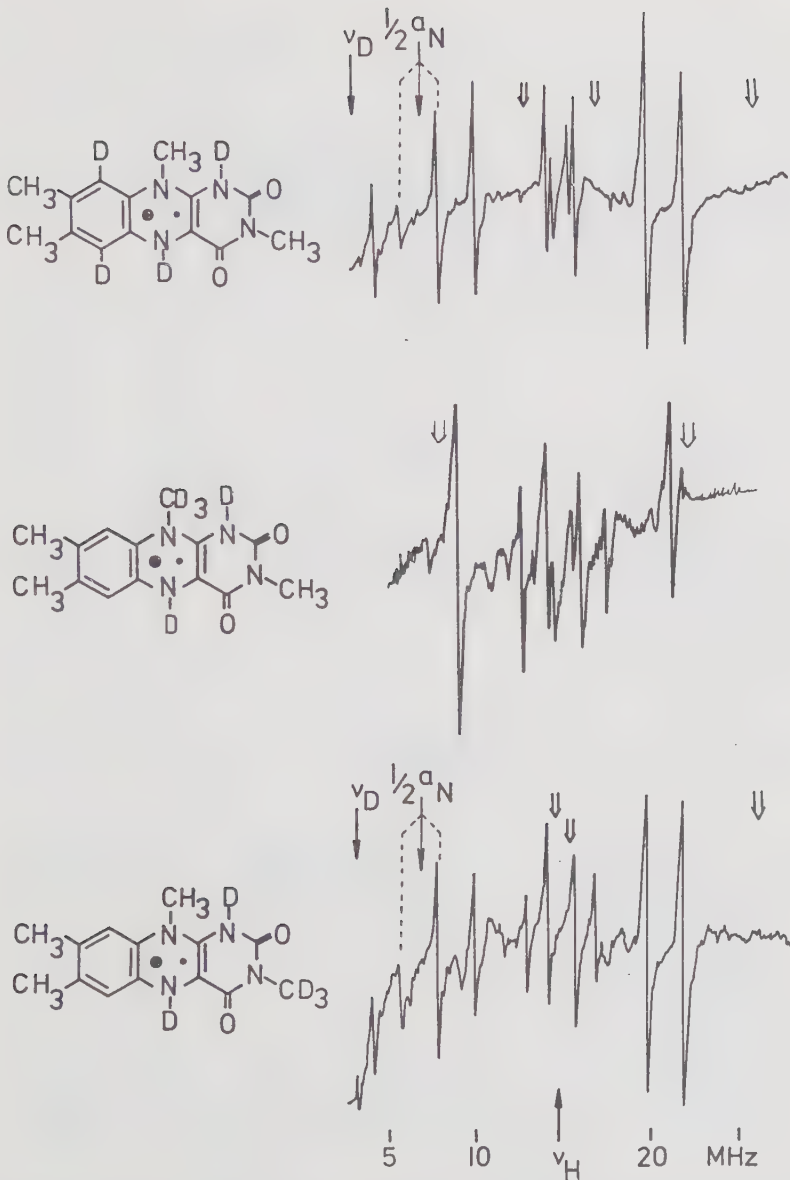


Abbildung 33. EPR-Spektren der Kationradikale $7a^{\bullet+}$, $7h^{\bullet+}$ und $7i^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOD bei 260 K



Abbildung 34. ENDOR-Spektren der Kationradikale $\underline{7b^{+\cdot}}$, $\underline{7c^{+\cdot}}$ und $\underline{7d^{+\cdot}}$ in Toluol/ CF_3COOH bei 260 K

nannten "Allendoerfer-Effekt", das heißt ihre Intensitäten sind auch von der Größe der HFSCs abhängig. So zeigen Methylprotonen geringere Anisotropie, da sie um die X-CH₃-Bindungsachse schnell rotieren können (s. auch Diskussion). Daraus folgt für diese Kerne ein gutes Relaxationsverhalten auch bei tieferen Temperaturen (200 K bis 240 K, bzw. auch in gefrorenen Lösungen), und man erhält intensive ENDOR-Signale. α -Protonen und β -Protonen von in ihrer Rotation behinderten Substituenten besitzen erheblich größere HFS-Anisotropie, ihre Kopplungen lassen sich erst bei höheren Temperaturen (260 K bis 280 K) nachweisen und geben entsprechend weniger intensive Linien im Spektrum.

Die EPR- und ENDOR-Spektren der ¹³C- und ¹⁵N-markierten Radikale zeigen leichte Unterschiede zu denen der unmarkierten Verbindungen. Aus den EPR-Spektren läßt sich nur die ¹³C-Kopplung der Position 4a zu etwa 0,25 mT aufgrund der größeren Gesamtaufspaltung bestimmen, die ähnlich der literaturbekannten ist /133/. Entsprechende Resonanzlinien im ENDOR-Spektrum liegen im Bereich von Protonenlinien (s. Abb. 35), so daß ihre eindeutige Bestimmung nicht möglich ist. Errechnet man aus den ¹⁴N-Kopplungen die Lage der ¹⁵N-Resonanzlinien, so stellt man fest, daß diese ebenfalls durch Protonenlinien überlagert sind. Auch sie sind also im ENDOR-Spektrum der Kationradikale nicht nachweisbar.

Das durch Methylierung in Position 5 stabilisierte Neutralradikal eines Lumiflavins 5CH₃-7v* eines in organischen Lösungsmitteln gut löslichen Derivates zeigt ein sehr gut aufgelöstes EPR-Spektrum aus etwa 31 Hauptlinien. Unter Hochauflösungsbedingungen sind sie noch einmal in 4 bis 6 Hyperfeinlinien aufgespalten (s. Abb. 36a). Die Gesamtaufspaltung des Spektrums ist um etwa 2 mT kleiner als die des Kationradikals.

Aus dem ENDOR-Experiment ergeben sich fünf Protonen- und zwei Stickstoffkopplungen (s. Tab. 13). Die größere Stickstoffkopplung läßt sich erst bei 300 K nachweisen (s. Abb. 36c). Das Messen bei Temperaturen von 210 K bis 300 K und das Studium der Linienintensitäten läßt, wie oben bereits beschrieben, Aussagen über die Relaxation der entsprechenden Kerne zu. Bei tiefen Temperaturen erscheinen nur Protonenlinien von Methylprotonen

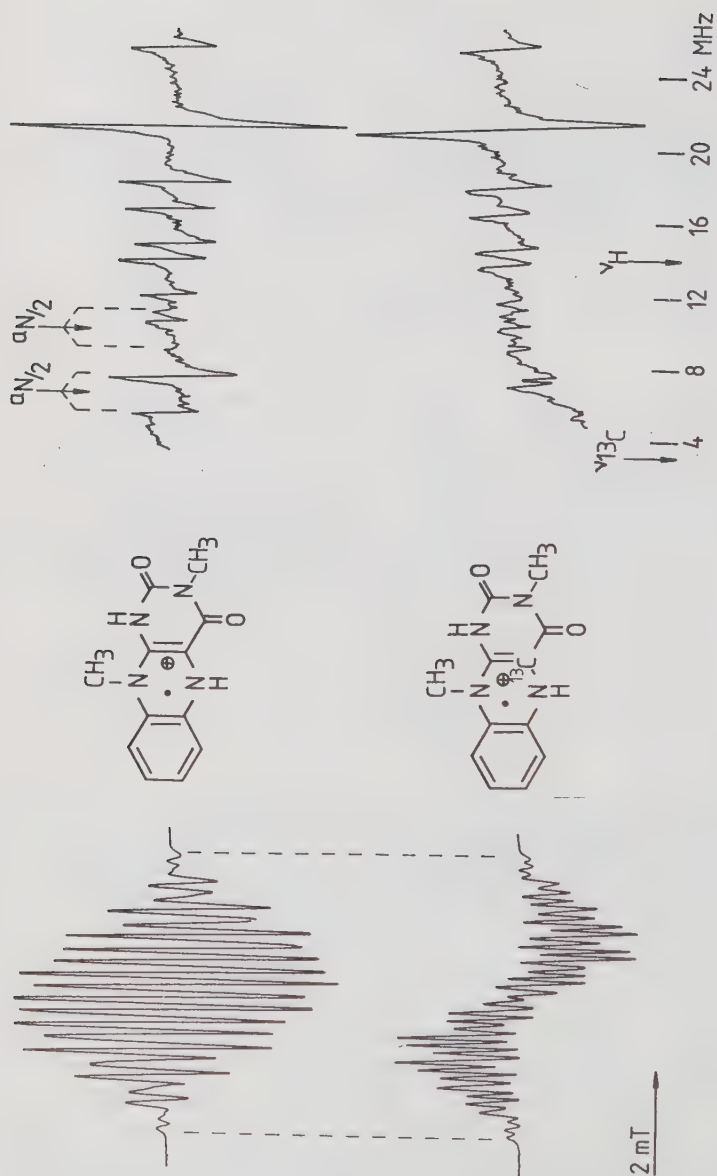


Abbildung 35. EPR- und ENDOR-Spektren der Kationradikale $7a^{\bullet+}$ und $7w^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH bei 260 K

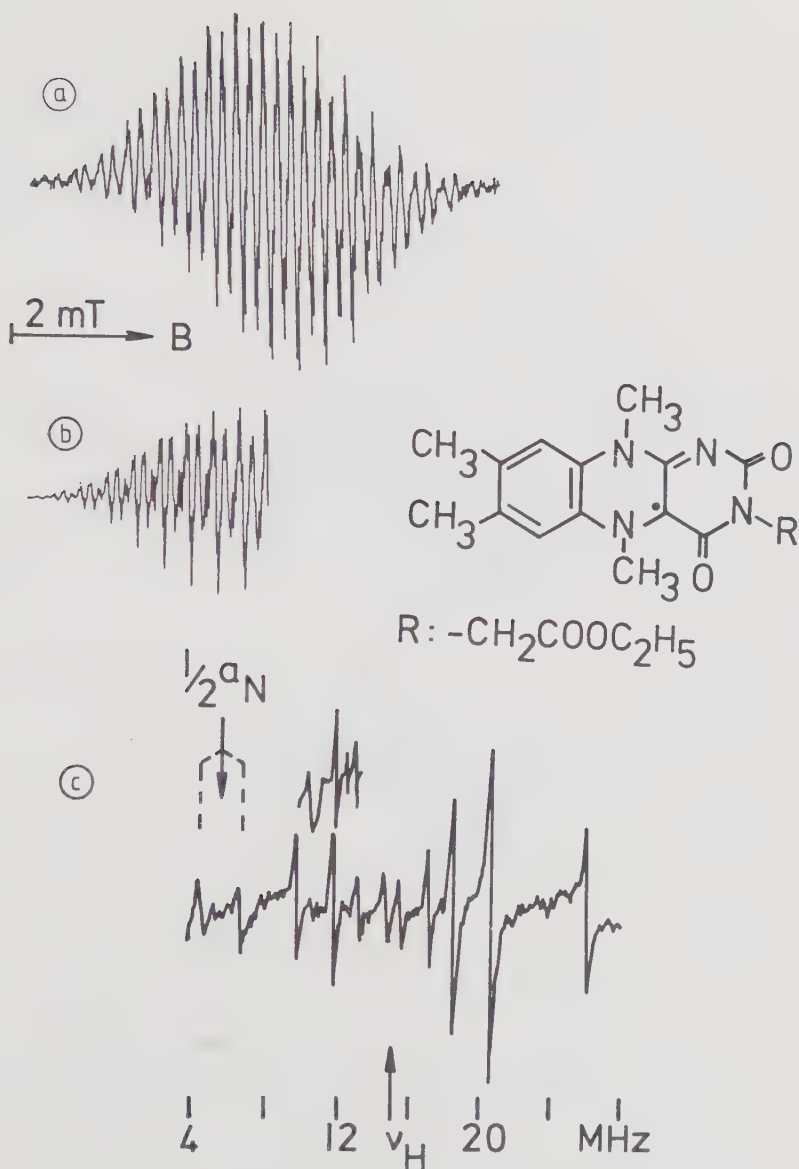


Abbildung 36. a) EPR-Spektrum von 5CH_3-7v^* in CH_2Cl_2 bei 260 K
 b) Simulation des EPR-Spektrums mit ENDOR-Daten
 c) ENDOR-Spektrum von 5CH_3-7v^* in CH_2Cl_2 bei 260 K

mit ausreichender Amplitude. Ansonsten wird die Zuordnung analog den Kationradikalen vorgenommen.

Eine Simulation des EPR-Spektrums mit den im ENDOR-Experiment gefundenen Kopplungen zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem experimentellen Spektrum, wobei diesmal auch kleinere Kopplungen berücksichtigt werden mußten (Abb. 36b). Größere Abweichungen der ENDOR-Daten des Neutralradikals von den EPR-Daten von Müller et al /31/ sind nicht feststellbar.

Die chemisch dargestellten Anionradikale der Lumiflavine ergeben intensive EPR-Signale mit einer Auflösung ähnlich denen der Kationradikale. Die Gesamtaufspaltung ist wie bei den Neutralradikalen um etwa 2 mT geringer als bei den Kationradikalen. Allerdings tritt in Lösungsmitteln mit basischem Charakter (z. B. DMF) oder auch bei nur geringen basischen Verunreinigungen eine Dimerisierung ein. Man erkennt dies an der braunen Färbung der Radikallösung (Monomer ist rot) und an einem breiten, unaufgelösten EPR-Signal /32/. ENDOR-in-Lösung war unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Die elektrolytisch dargestellten Anionradikale geben EPR-Spektren wie in Abbildung 37b, c und d. Interessant sind die Bedingungen der Reduktion. Aus dem cyclischen Voltammogramm (Abb. 37a) geht eine optimale Reduktionsspannung für die Erzeugung des Anionradikals von etwa 1 V hervor. Bei externer Elektrolyse für das ENDOR-Experiment entsteht eine optimale Radikalkonzentration in HMPA erst bei relativ hohen Spannungen von -2,3 V bis -2,7 V ($E_o^{FMN} = -0,22$ V). Die Elektrolyse benötigt sehr viel Zeit, was für schlechte Diffusion der beteiligten Teilchen und/oder Zwischenreaktionen spricht. Extrem wichtig für die Produktion des Anionradikals ist die Reinheit des Lösungsmittels. Bei leichten, wahrscheinlich basischen Verunreinigungen entsteht schon ohne Elektrolyse ein Radikal, wahrscheinlich ein Dimeres (s. o.), das eine bräunliche Färbung und EPR-Spektren mit anderer Gesamtaufspaltung zeigt (s. Abb. 37d).

ENDOR-Spektren der elektrochemisch erzeugten Anionradikale von 7v und 7h sowie des Dimerenradikals in HMPA konnten aufgezeichnet werden (s. Abb. 38), während Lumichrom nach

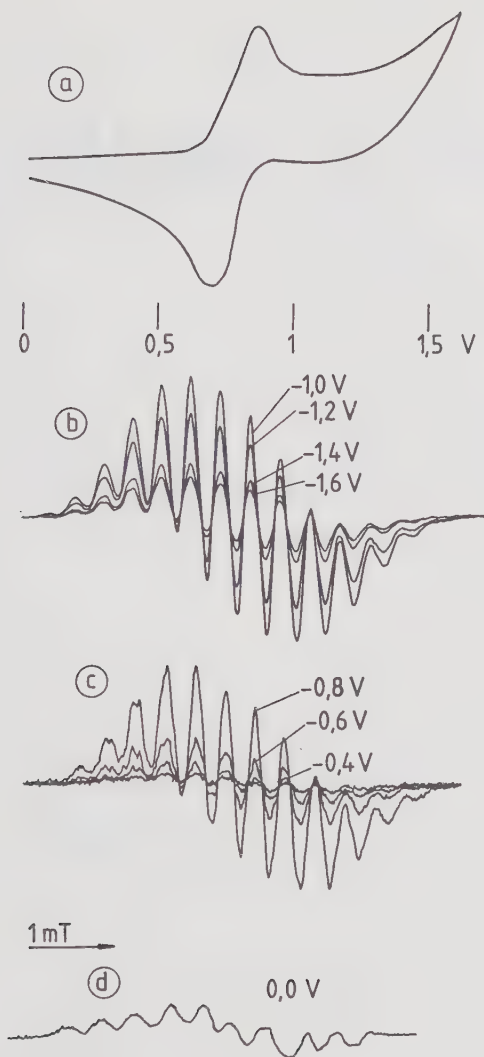
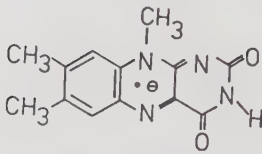
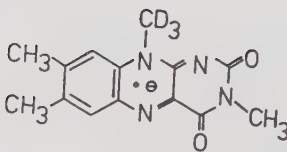
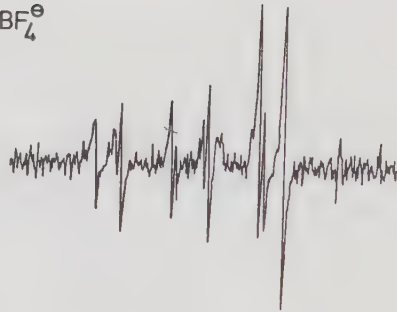


Abbildung 37. a) Cyclisches Voltammogramm von Lumiflavin $7v$ in $HMPA/TBA^+BF_4^-$
 b,c) EPR-Spektren von $7v^{\bullet-}$ in $HMPA/TBA^+BF_4^-$ bei verschiedenen Spannungen
 d) EPR-Spektrum eines Dimeren in verunreinigtem Lösungsmittel (s. Text)

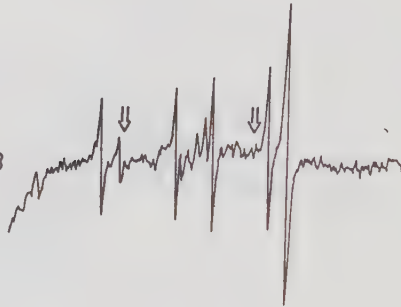
ENDOR HMPA/TBA⁺BF₄⁻



290K



290K



„Dimer“

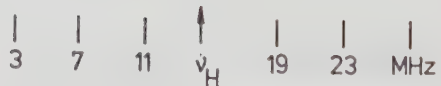


Abbildung 38. ENDOR-Spektren von den Anionradikalen $7v^{\bullet-}$ und $7h^{\bullet-}$ in HMPA/TBA⁺BF₄⁻ bei 290 K, $U = 2,7$ V; ENDOR-Spektrum des Dimeren (s. Text)

Tabelle 13. Isotrope Kopplungskonstanten der Isoalloxazin-Radikale, [MHz] $\pm$ 0,02 MHz

Nr.	a_3^H	a_5^N	$a_{5\alpha/\beta}^H$	a_6^H	a_7^H	a_8^H	a_9^H	a_{10}^N	$a_{10\beta}^H$
<u>7a^{•+}</u>		20,66	-23,06	-4,81	-0,90	-7,79		13,47	+14,09 ^A
		20,63	21,72	4,91	1,12	7,57	1,37	13,97	14,10 ^B
<u>7b^{•+}</u>	0,98	20,32	22,71	-4,13	+1,46	-8,64		13,87	+14,18 ^A
		20,27	21,61	4,37	1,32	8,04	0,87	13,71	14,07 ^B
<u>7c^{•+}</u>	+0,86	21,00	-23,26	-4,75	-1,43	+9,54		13,10	+13,88 ^A
		20,91	21,92	4,93	1,32	8,91	1,68	13,37	13,48 ^B
<u>7d^{•+}</u>	0,83	20,66	-22,06	+2,48	-1,32	+8,88		13,42	14,22 ^A
<u>7e^{•+}</u>	0,90	20,73	-22,70	-4,03	+1,53	+9,95		13,19	+13,82 ^A
		20,52	21,84	4,32	1,40	9,03	1,12	13,32	13,93 ^B
<u>7f^{•+}</u>	0,90		3,68 ^C	3,97	1,65	9,90		13,32	14,07 ^C
<u>7g^{•+}</u>	0,90		3,63 ^C	-	1,64	9,84		13,34	14,04 ^C
<u>7h^{•+}</u>	0,88	22,56	3,56 ^C	3,86	1,58	9,88		13,20	2,00 ^C
<u>7i^{•+}</u>	-		3,73 ^C	3,96	1,60	9,88		13,40	14,04 ^C
<u>7j^{•+}</u>		20,38	21,53	4,54		9,53		13,06	13,74 ^D
		23,83	32,24			9,53		12,05	13,17 ^E
<u>7v[•]</u>		22,08	+21,82	-3,98	+0,83	+6,81		9,96	+11,02 ^F
		22,42	21,58	4,77		6,73		10,09	10,93 ^G
<u>7v^{•-}</u>			-	-9,05	+1,56	+11,4	-2,32		+8,34 ^H
		20,46	-	9,81		11,2	2,52	8,41	8,97 ^I
<u>7h^{•-}</u>	+0,49		-	-9,01	+1,54	+11,3	-2,28	8,09	^H
<u>7v^{•-}</u>				8,02	1,54	3,06	2,45		7,08 ^J

^A Diese Arbeit, ENDOR in Toluol/CF₃COOH, 260 K, a_5^N bei 310 K

^B Literaturstelle /26/, EPR in Acetonitril/HCl

^C Diese Arbeit, ENDOR in Toluol-d₈/CF₃COOD, $a_{5\alpha}^H$ und bei 7h^{•+} $a_{10\beta}^H$ sind Deuteriumkopplungen

^D Literaturstelle /30/, EPR in HCl

^E Literaturstelle/34,35/, EPR in HCOOH

^F Diese Arbeit, ENDOR in CH₂Cl₂, 260 K, a_5^N bei 300 K; 7v[•] trägt in Position 5 eine Methylgruppe

^G Literaturstelle /31/, EPR in CHCl₃

^H Diese Arbeit, ENDOR in HMPA, 290 K, Dimeres s. Text (J)

^I Literaturstelle /32/, EPR in DMF

Elektrolyse unter ähnlichen Bedingungen nicht in eine paramagnetische Stufe überführt werden konnte. Aus den Spektren lassen sich die in Tabelle 13 aufgeführten Protonenkopplungen für Messungen in HMPA zwischen 280 K und 340 K entnehmen. In diesem Temperaturbereich konnte nur eine kleinere Stickstoffkopplung für Position 10 gemessen werden. Die Daten sind durchaus den EPR-Literaturwerten chemisch dargestellter Anionradikale ähnlich /32,37/.

Im Unterschied zu den Kation- und Neutralradikalen ist hier die größte Protonen-HFSC für Position 8 gefunden worden, während der Wert für die Methylkopplung von Position 10 sogar kleiner als der für das Proton in Position 6 ist. Weiterhin kann wahrscheinlich die Kopplung von 2 MHz mit negativem Vorzeichen nur der Position 9 zugeordnet werden. Beim Anionradikal existiert hier also eine meßbare Spindichte.

Für die Kopplungskonstanten des in verunreinigtem HMPA aufgenommenen Radikals (wahrscheinlich das Dimere) können hier nur Vorschläge der Zuordnung zu Molekülpositionen gemacht werden. Es liegen nämlich noch keine Vergleichsspektren deuterierter Verbindungen vor, und die Struktur dieses Dimeren ist in der Literatur noch nicht eindeutig aufgeklärt /32/.

Die EPR-Spektren einiger Lumiflavin-Radikale in wäßrigen Lösungen zeigen ähnlich schlechte Auflösungen und sind mit Literaturspektren gut vergleichbar. ENDOR-Spektren dieser Proben konnten nicht erhalten werden. Einerseits dämpft Wasser sehr stark Mikrowellen, so daß Meßröhrchen mit Durchmessern von höchstens 1 mm erforderlich sind. Damit können nur geringe Radikalkonzentrationen im ENDOR-Resonator erreicht werden. Andererseits hat Wasser (auch im Gemisch mit Glycerin) bis zum Gefrierpunkt eine Viskosität, die es nicht erlaubt, eine optimale Rotations-Korrelations-Zeit für die Flavin-Radikale zu erreichen (s. auch Diskussion).

Substituierte Lumiflavine:

Sind im benzoiden Teil des Isoalloxazins andere Substituenten als Wasserstoff oder Methylgruppen, so sind trotzdem die EPR-Spektren der Kationradikale ähnlich denen der unsubstituierten

Lumiflavin-Kationradikale. $7m^{\bullet+}$ zeigt im ENDOR-Spektrum unter anderem zwei Kopplungen von etwa 9 MHz (Abb. 39). Die Vorstufe ist nur als Nebenprodukt aus der Synthese des normalen Lumiflavins $7e$ hervorgegangen und anscheinend durch Oxidation von $7e$ in nur sehr geringer Ausbeute entstanden.

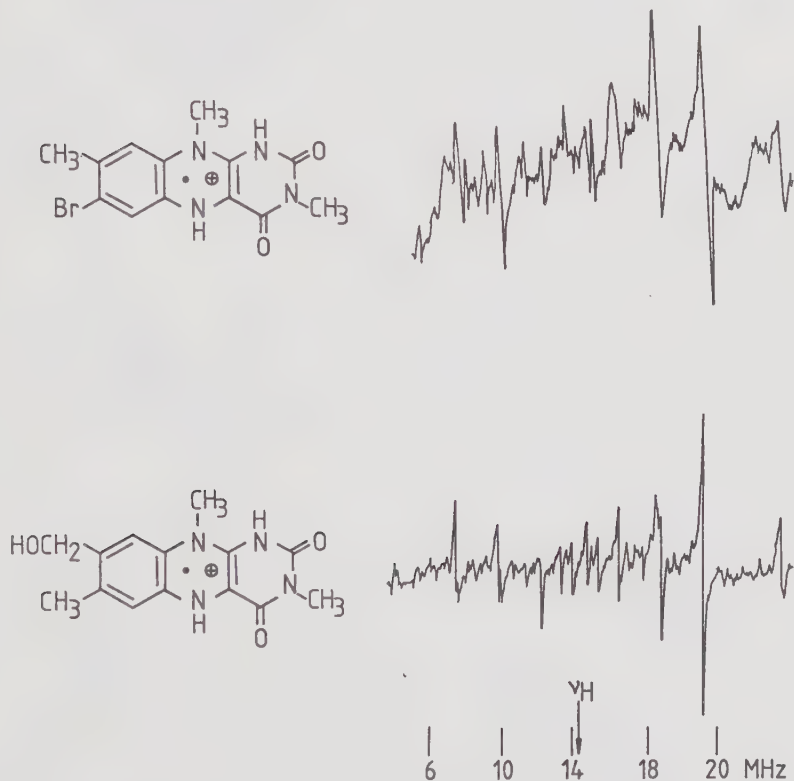


Abbildung 39. ENDOR-Spektren der Kationradikale $7l^{\bullet+}$ und $7m^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH bei 260 K

Vom 8-Brom-Lumiflavin-Kationradikal konnte kein ENDOR-Spektrum aufgenommen werden, da sich das Radikal nach relativ kurzer Zeit zersetzt, während vom 7-Brom-Lumiflavin-Kationradikal $7l^{\bullet+}$ fünf Protonenkopplungen im ENDOR-Experiment gemessen werden

konnten (Abb. 39b, Tab. 14). Für $7m^{\bullet+}$ können die Werte nur vorläufig den Molekülpositionen zugeordnet werden, da weitere Strukturbeweise bisher fehlen. Im Falle von $7l^{\bullet+}$ fehlt gegen- über dem Lumiflavin-Kationradikal nur die Kopplung für Position 7.

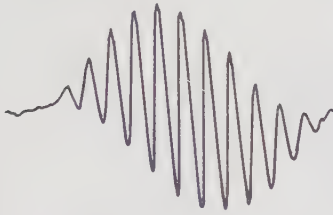
Tabelle 14. Isotrope Kopplungskonstanten von modifizierten Isoalloxazin-Kationradikalen, [MHz] $\pm$ 0,02 MHz

Nr.	a_3^H	a_5^N	$a_{5\alpha}^H$	a_6^H	a_7^H	a_8^H	a_{10}^N	$a_{10\beta}^H$
$7l^{\bullet+}$	0,78		22,47	4,32		8,81		14,09 ^A
$7m^{\bullet+}$	0,82			4,33	2,04	9,22/ 8,76		14,02 ^A

^A Diese Arbeit, ENDOR in Toluol/ CF_3COOH , 260 K
Coenzyme und ihre Modellverbindungen:

Die Verbindungen $7q$ bis $7u$ enthalten in Position 10 sperrige Substituenten mit zum FAD hin zunehmender Größe. Aufgrund der Zunahme des effektiven Radikalvolumens und damit sich ver- größernder optimaler Rotations-Korrelations-Zeit nimmt die Auflösung der EPR-Spektren bei gleichen Aufnahmebedingungen zum $FAD^{\bullet+}$ hin ab (s. Abb. 40).

Die ENDOR-Spektren dieser Radikale und der paramagnetischen Stufen von einigen Modellverbindungen mit anderen sperrigen Resten in Position 10 müssen infolge der geringeren Beweglich- keit der großen Moleküle bzw. der stark geänderten Rotations- Korrelations-Zeit bei noch höheren Temperaturen aufgenommen werden als die Lumiflavin-Kationradikale, so daß Protonen- kopplungen nun bei 280 K bis 300 K optimal gemessen werden können und Stickstofflinien großer Spindichten erst bei etwa 320 K gut erkennbar sind. Auffällig für alle Verbindungen ist das Fehlen der 10-Methyl-Kopplung von 14 MHz und das Auftreten von zwei relativ breiten Linien bei etwa 11 MHz und 18 MHz für die β -Protonenkopplung des in seiner Rotation behinderten Substituenten in Position 10 (s. Abb. 41 und 42). Sowohl bei $7q^{\bullet+}$ als auch beim $FMN^{\bullet+}$ und $FAD^{\bullet+}$ können diese in jeweils zwei Signale aufgespalten sein. Aufgrund der behinderten Rotation der großen Substituenten in Position 10 um ihre $N-CH_2$ -Bindungsachsen stellen sich Vorzugskonformationen des

Lumichrom $\bullet^+$ TARF $\bullet^+$ Lumiflavin $\bullet^+$ FMN $\bullet^+$ Riboflavin $\bullet^+$ FAD $\bullet^+$ 

2 mT 

Abbildung 40. EPR-Spektren von Isoalloxazin-Kationradikalen mit zunehmend großen Substituenten in Position 10

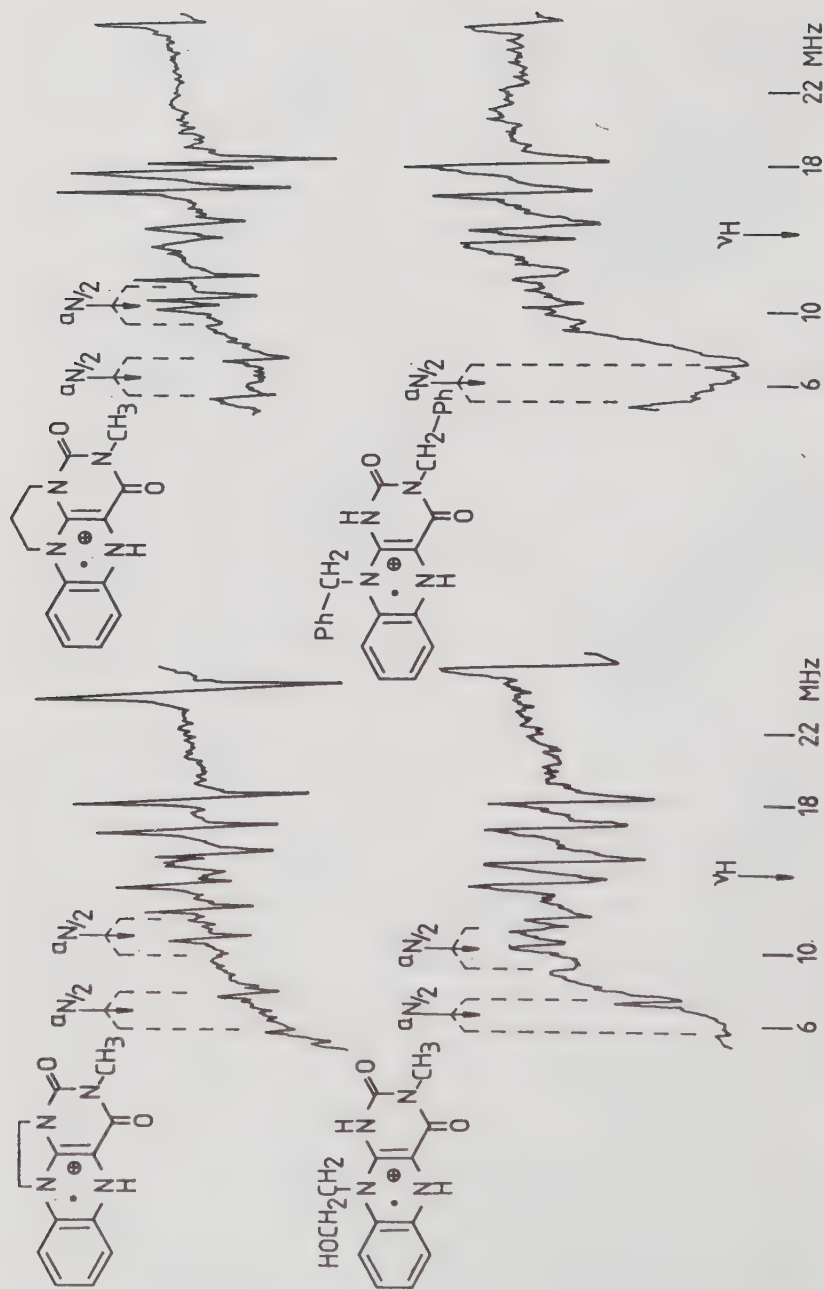


Abbildung 41. EPR-Spektren der Kationradikale **7a^{•+}**, **7b^{•+}**, **8a^{•+}** und **8b^{•+}** in Toluol/CF₃COOH bei 280 K

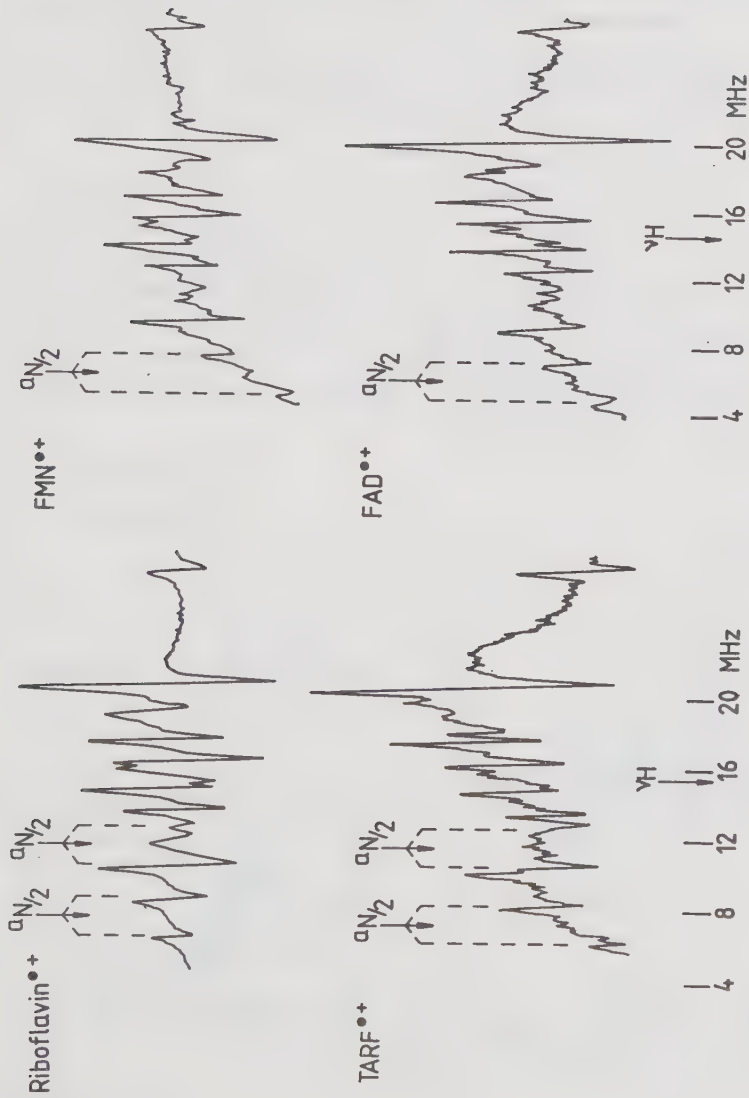


Abbildung 42. EPR-Spektren der Kationradikale $\underline{7p^{\bullet+}}$, $\underline{7q^{\bullet+}}$, $\underline{7t^{\bullet+}}$ und $\underline{7u^{\bullet+}}$ in Toluol/ CF_3COOH bei 290 K

Restes zum Isoalloxazingerüst ein. Wie in der Diskussion ausführlicher beschrieben, ergeben sich aufgrund der Winkel zwischen der CH_2 -Bindung und dem Isoalloxazin-System kleinere HFSCs als bei einer Methylgruppe. Sind die beiden Methylenprotonen nicht mehr äquivalent, kann man unter Hochauflösungsbedingungen manchmal zwei ENDOR-Kopplungen messen (s. Tab. 15).

Das Tetraacetyl-Riboflavin 7q ist gut löslich in Methylenchlorid, so daß ein Neutralradikal nach bewährten Darstellungsmethoden in guter Konzentration erhalten werden kann. Es gelang hier erstmals, ein EPR- und ein ENDOR-Spektrum von 5CH_3 -7q $^\bullet$ aufzunehmen. Somit können keine Vergleiche mit EPR-Daten der Literatur vorgenommen werden. Das EPR-Spektrum ist etwas besser aufgelöst als das des Kationradikals. Die Zuordnung der HFSCs aus den ENDOR-Experimenten (Abb. 43) erfolgte analog der der protonierten Stufe des Radikals.

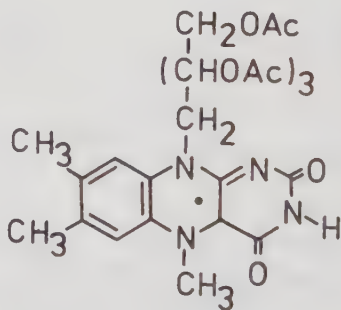
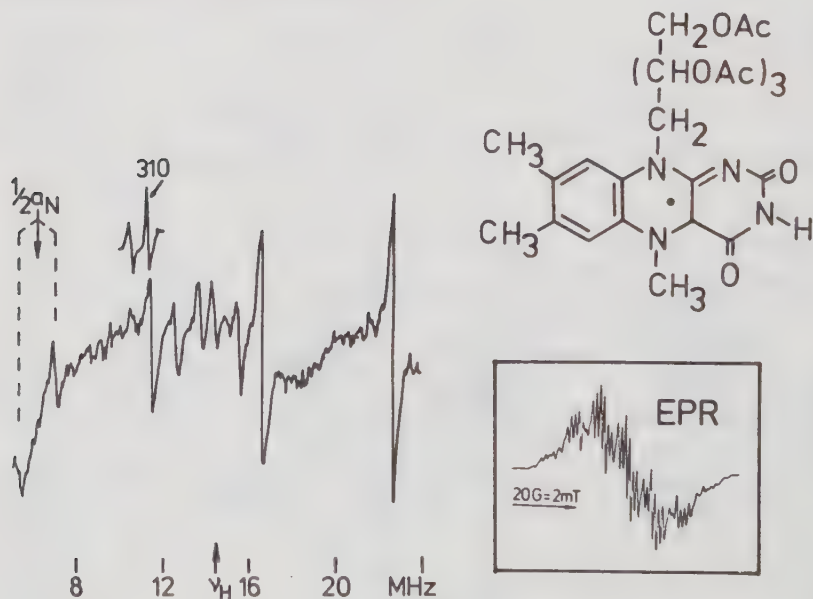


Abbildung 43. EPR- und ENDOR-Spektrum von 5CH_3 -7q $^\bullet$ in CH_2Cl_2 bei 260 K

Wie schon vorher beschrieben, konnte ebenfalls ein EPR- und ein ENDOR-Spektrum des Tetraacetyl-Riboflavin-Anionradikals $7q^{\bullet-}$ nach elektrochemischer Reduktion des Ausgangsmaterials in HMPA erhalten werden (Abb. 44). Die gemessenen Kopplungen des Anionradikals werden analog dem Lumiflavin-Anionradikal den Molekülpositionen zugeordnet (Tab. 15).

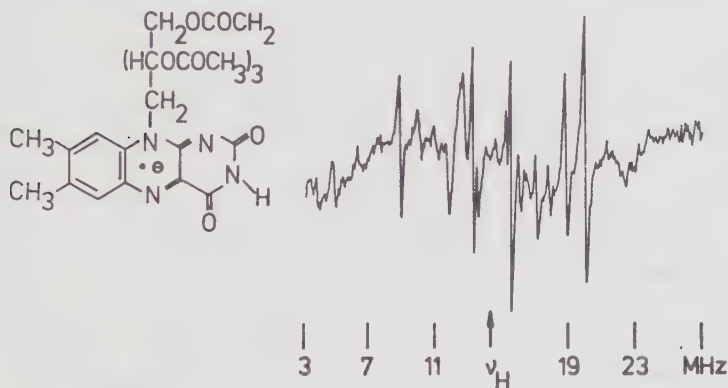


Abbildung 44. ENDOR-Spektrum von $7q^{\bullet-}$ in $\text{HMPA}/\text{TBA}^+\text{BF}_4^-$ bei 300 K

Als Modell für Flavoenzyme, die kovalent über Position 8 mit dem Protein verbunden sind (z. B. Succinat-Dehydrogenase), dient das 8 α -Morpholino-Tetraacetyl-Riboflavin $7r$. Das Kationradikal dieser Verbindung ist nicht sehr stabil und ergibt ein unaufgelöstes EPR-Spektrum mit geringer Signalamplitude. Ebenso kann man im ENDOR-Spektrum nur intensitätsschwache Protonenlinien erhalten. Die relativ starken Signale für Protonenkopplungen der Positionen 8 und 10 treten im Gegensatz zu den Lumiflavin-Kationradikalen nicht mehr auf. Dafür kann man einige breite Linien für kleinere Kopplungen registrieren, die wohl den β -Protonen der sperrigen Substituenten im Molekül zuzuordnen sind.

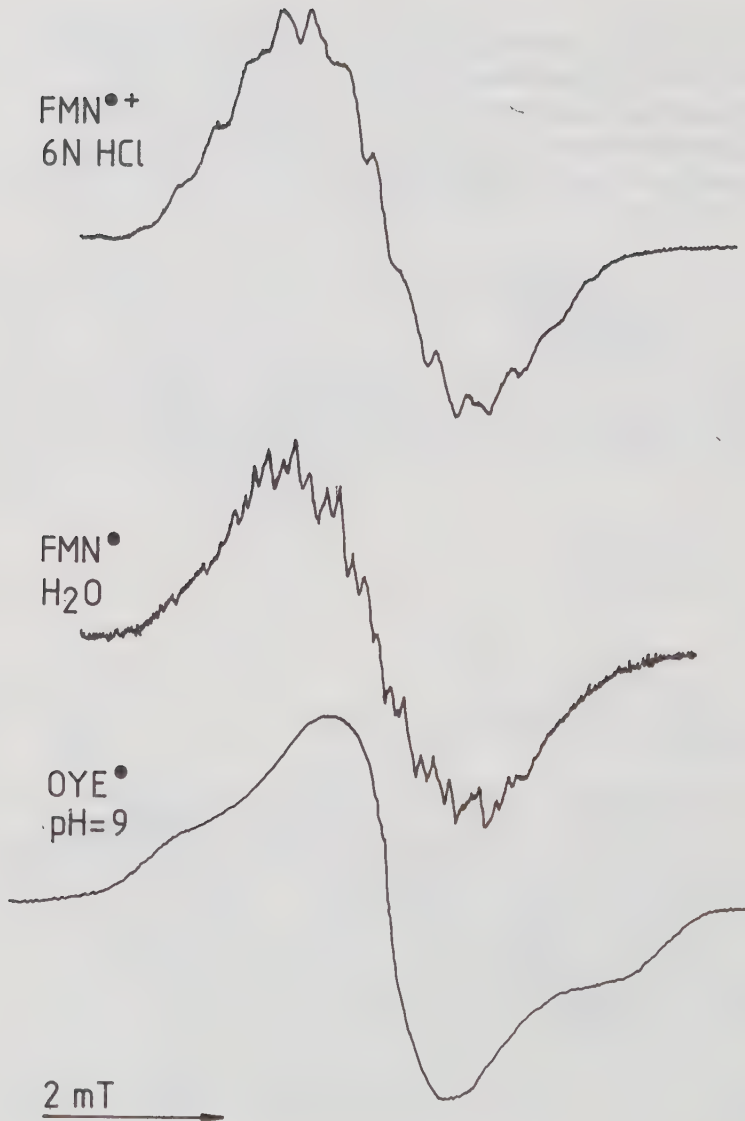


Abbildung 45. EPR-Spektren einiger Flavin-Radikale in wässrigen Lösungen bei Raumtemperatur

Tabelle 15. Isotrope Kopplungskonstanten der Flavin-Coenzym-Radikale sowie einiger Modellradikale, [MHz] $\pm$ 0,02 MHz

Nr.	a_3^H	a_5^N	$a_{5\alpha/\beta}^H$	a_6^H	a_7^H	a_8^H	a_{10}^N	$a_{10\beta}^H$
$7n^{\bullet+}$				4,71	0,70	7,85	12,53	7,85 ^A
$7o^{\bullet+}$		21,12	23,40	4,87	0,94	8,02	13,07	7,04 ^A
$7p^{\bullet+}$	-0,81	21,16	-23,29	-4,06	+1,60	+10,34	13,01	+7,34 ^A
$7q^{\bullet+}$		21,68	23,02	4,10	1,48	10,28	12,87	9,70/5,11 ^A
$7r^{\bullet+}$	0,89		22,58	4,77		4,87	12,99	8,90 ^A
$7s^{\bullet+}$			23,04	4,03	1,20	8,88		8,88/4,80 ^A
$7t^{\bullet+}$	0,81		22,96	3,94	1,61	10,22	12,76	7,44/6,95 ^A
$7u^{\bullet+}$	0,79	21,09	22,86	3,96	1,61	10,27	12,88	7,49/6,91 ^A
$7q^{\bullet-}$		22,58	22,22	3,91	0,86	8,70	9,02	6,70 ^B
$7q^{\bullet-}$				8,78	1,78	11,14		5,42/3,36 ^C
$8a^{\bullet+}$	0,79	21,21	19,66	4,49	1,57	7,73	12,89	7,73/4,49 ^A
$8b^{\bullet+}$		20,51	22,90	4,97	1,23	7,93	12,76	7,93/4,97 ^A

A ENDOR in Toluol/ CF_3COOH , 280 K, a_5^N bei 310 K

B ENDOR in CH_2Cl_2 , 260 K, $7q^{\bullet-}$ trägt in Pos. 5 eine Methylgruppe

C ENDOR in HMPA, 330 K

Außerdem wurden die EPR-Spektren der wäßrigen Lösungen von FMN-Kation- und Neutralradikalen in flüssigen Phasen aufgenommen, ebenso wie entsprechende EPR-Spektren der NADPH-Dehydrogenase (Old Yellow Enzyme) im wäßrigen Puffersystem (Abb. 45). Die g-Faktoren und Auflösungen sind mit bekannten Ergebnissen vergleichbar /44,45/. ENDOR-Versuche an den flüssigen wäßrigen Lösungen führten allerdings zu keinen Ergebnissen. Eine mögliche Erklärung hierfür wird in der Diskussion gegeben.

Thiaalloxazin-Radikale

Die Kationradikale der Thiaalloxazine und auch der Thiaisoalloxazine lassen sich in Trifluoressigsäure/Toluol gut spektroskopieren. Die optimale Mikrowellenleistung zur teilweisen Sättigung der EPR-Signale beträgt nur etwa 30 mW, während die RF-Leistung ebenso hoch wie bei Flavinen sein muß. Man erhält bei 260 K sowohl alle Protonen- als auch die Stickstoffkopplungen. Allerdings kommt es in einigen Fällen vor, daß

die hochfrequente Stickstofflinie mit einer tieffrequenten Protonenlinie zusammenfällt.

Ähnlich den Alloxazinen enthalten die Thiaalloxazine in Position 10 keinen Alkylrest. Das Thialumichrom 9e konnte nur in sehr geringer Menge hergestellt und massenspektroskopisch identifiziert werden. Das EPR-Spektrum des Kationradikals ergibt, ebenso wie die aller ähnlichen Verbindungen, vier Hauptgruppen durch Wechselwirkung des ungepaarten Elektrons mit einem Stickstoffatom und einem Proton etwa gleicher Kopplung (s. Abb 46). Bei einigen Substanzen können weitere Aufspaltungen erkannt werden. Wieder ist sehr deutlich die Auswirkung der hohen HFS-Anisotropie des Stickstoffkernes auf die Intensität der Hochfeldlinien zu erkennen. Werden die Proben in deuterierten Lösungsmitteln gemessen, so erscheinen nur noch drei EPR-Linien, was für ein austauschbares Proton mit großer Kopplung spricht.

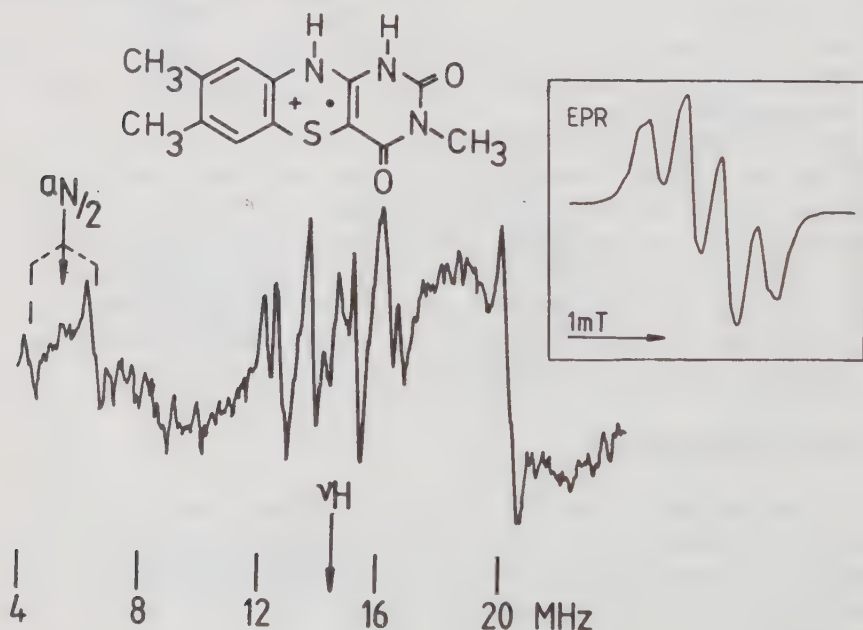


Abbildung 46. EPR- und ENDOR-Spektrum des Kationradikals 9e^{•+} in Toluol/CF₃COOH bei 260 K

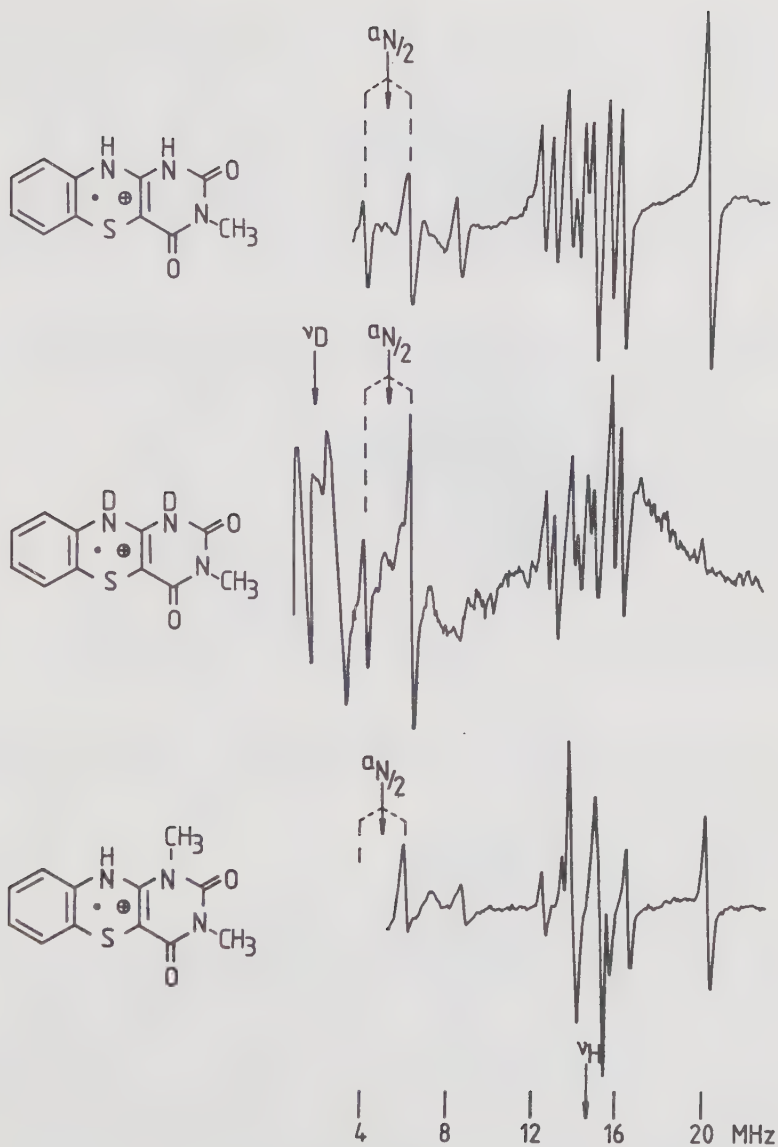


Abbildung 47. ENDOR-Spektren der Kationradikale $9a^{\bullet+}$ und $9j^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH sowie $9j_3^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH

Aus den ENDOR-Spektren mit zum Teil sehr intensiven Signalen lassen sich eine Stickstoff- und fünf Protonenkopplungen entnehmen (Abb. 46 und 47, Tab. 16). In deuterierten Lösungsmitteln entfällt die große Protonen-HFSC für die Position 10. Hier tritt dann allerdings eine hochfrequente Deuteriumlinie auf. In der Literatur sind bisher nur EPR-Spektren dieser Verbindungen bekannt, aus denen nur die große Stickstoffkopplung inklusive NH-Protonen-HFSC abgeschätzt werden konnte /57,107/.

Tabelle 16. Isotrope Kopplungskonstanten der Thiaalloxazin-Kationradikale in Toluol/ CF_3COOH , [MHz] $^{\pm}$ 0,02 MHz

Nr.	a_3^H	a_6^H	a_7^H	a_8^H	a_{10}^N	$a_{10\alpha}^H$
<u>9a$\cdot^+$</u>	-1,23	-0,39	-2,72	-3,86	10,90	-11,79
<u>9j$\cdot^+$</u>	+1,41		-2,09	-4,00	10,26	-11,56 ^A
<u>9e$\cdot^+$</u>			1,50	3,70		11,60
<u>9j$\cdot^+$</u>					10,17	10,17 ^B

^A In Toluol- d_8 / CF_3COOD $a_{10\alpha}^D = 1,03$ MHz

^B Literaturstelle /107/, EPR in CF_3COOH

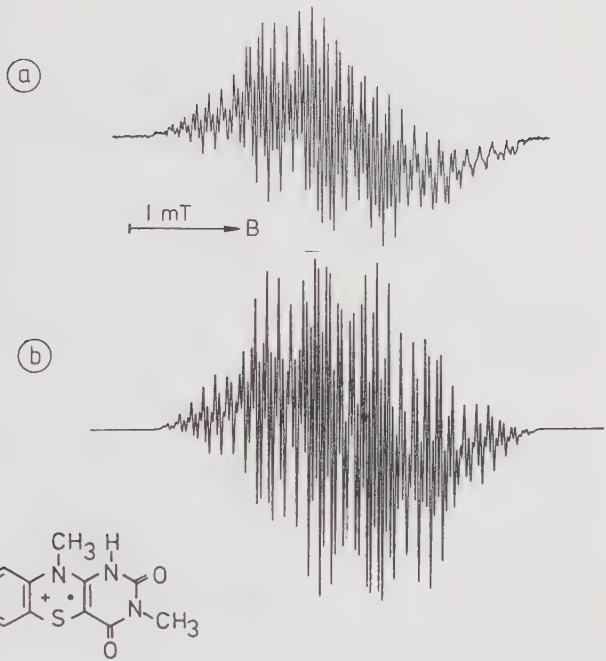
Auch von den Thiaalloxazinen konnten keine Anion- und Neutralradikale gewonnen werden.

Thiaisoalloxazin-Radikale

Thialumiflavine

Das EPR-Spektrum des Kationradikals eines Thiaflavins zeigt meist sechs Hauptgruppen, die noch weiter strukturiert sein können (s. Abb. 48a). Es handelt sich also um eine Stickstoff- und eine Protonenkopplung von drei Methylprotonen. Deuterierte Lösungsmittel verändern das Bild nicht. Im Falle des 6,8-Dimethyl-Thiaflavin-Kationradikals 10d $\cdot^+$ hat das EPR-Spektrum allerdings ein komplizierteres Aussehen. Der Ersatz der 10-Methylgruppe durch eine Deuteromethylgruppe bedeutet nur noch drei Hauptlinien im Spektrum mit diversen Hyperfein-

ESR



ENDOR

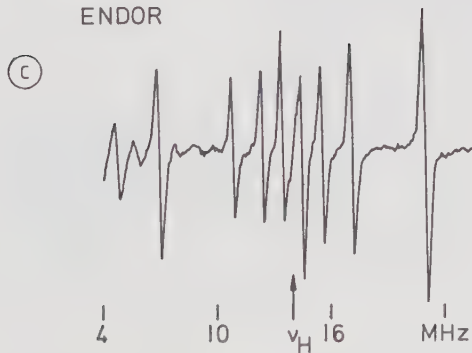


Abbildung 48. a) EPR-Spektrum von $9e^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH
 b) EPR-Simulation mit den ENDOR-Daten
 c) ENDOR-Spektrum von $9e^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH
 bei 260 K

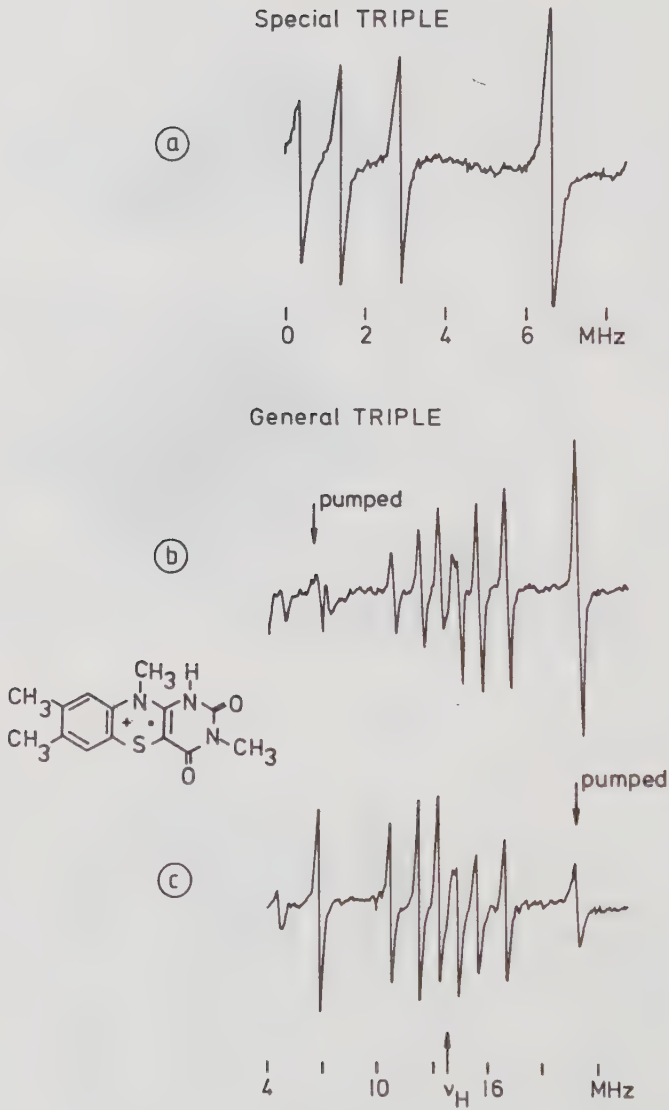


Abbildung 49. a) Special-TRIPLE-Spektrum von $9e^{*+}$
 b,c) General-TRIPLE-Spektren von $9e^{*+}$

linien (Abb. 51).

Die ENDOR-Spektren sind ähnlich denen der Thiaalloxazin-Kationradikale (Abb. 48, 50). Man bekommt vier bis fünf Protonen- und eine Stickstoffkopplung (Tab. 17). Nur im Falle des 6,9-d₂-Thiaflavin- und beim 10-CD₃-Thiaflavin-Kationradikal fallen Protonenkopplungen weg (Abb. 51). Die Zuordnung eines größeren HFS-Wertes von 3 MHz muß entgegen den EPR-Daten der Literatur der Position 7 zugeordnet werden. Der Vergleich von verschiedenen methylsubstituierten Verbindungen spricht dafür (Abb. 50). Weiterhin kann die Kopplung von 1 MHz nur Position 3 zugeordnet werden, da sie nach Deuterierung anderer Positionen nicht wegfällt und nach Substitution anderer Methylgruppen durch Wasserstoff sich nicht ändert. Die entsprechende Stickstoffkopplung ist anscheinend unmeßbar klein.

Man erkennt auch leichte Unterschiede der Werte in verschiedenen Lösungsmittelgemischen. So erhält man veränderte Daten der Kationradikale 10a^{•+} und 10e^{•+} in Nitromethan nach Oxidation mit Schwefelsäure oder Aluminiumtrichlorid. Allerdings zeigt das ENDOR-Spektrum von 10a^{•+} in Nitromethan/AlCl₃ einen doppelten Satz von Protonenkopplungen. Hier scheint durch eine Nebenreaktion ein anderes Radikal entstanden zu sein. Mögliche Reaktionen sind bereits diskutiert worden /115/.

Aufgrund der Synthese des 7,8-Dimethyl-Thiaflavins sind zwei Isomere als Produkte möglich (s. auch 3.3.1.): 7,8-Dimethyl- (10e) und 6,7-Dimethyl-Thiaflavin (10v). Das ENDOR-Spektrum in Abbildung 52 von 10e^{•+} zeigt eine weitere Protonenkopplung von etwa 5 MHz mit Resonanzlinien geringer Intensität. Der Vergleich mit den Daten des 7-Methyl-Thiaflavin-Kationradikals 10b^{•+} läßt die Annahme zu, das dieses Linienpaar von 10v^{•+} als Verunreinigung in der paramagnetischen Probe von 10e^{•+} stammt. Nach mehrmaligem Umkristallisieren konnte auch ein ENDOR-Spektrum des reinen 7,8-Dimethyl-Isomeren erhalten werden (Abb. 48).

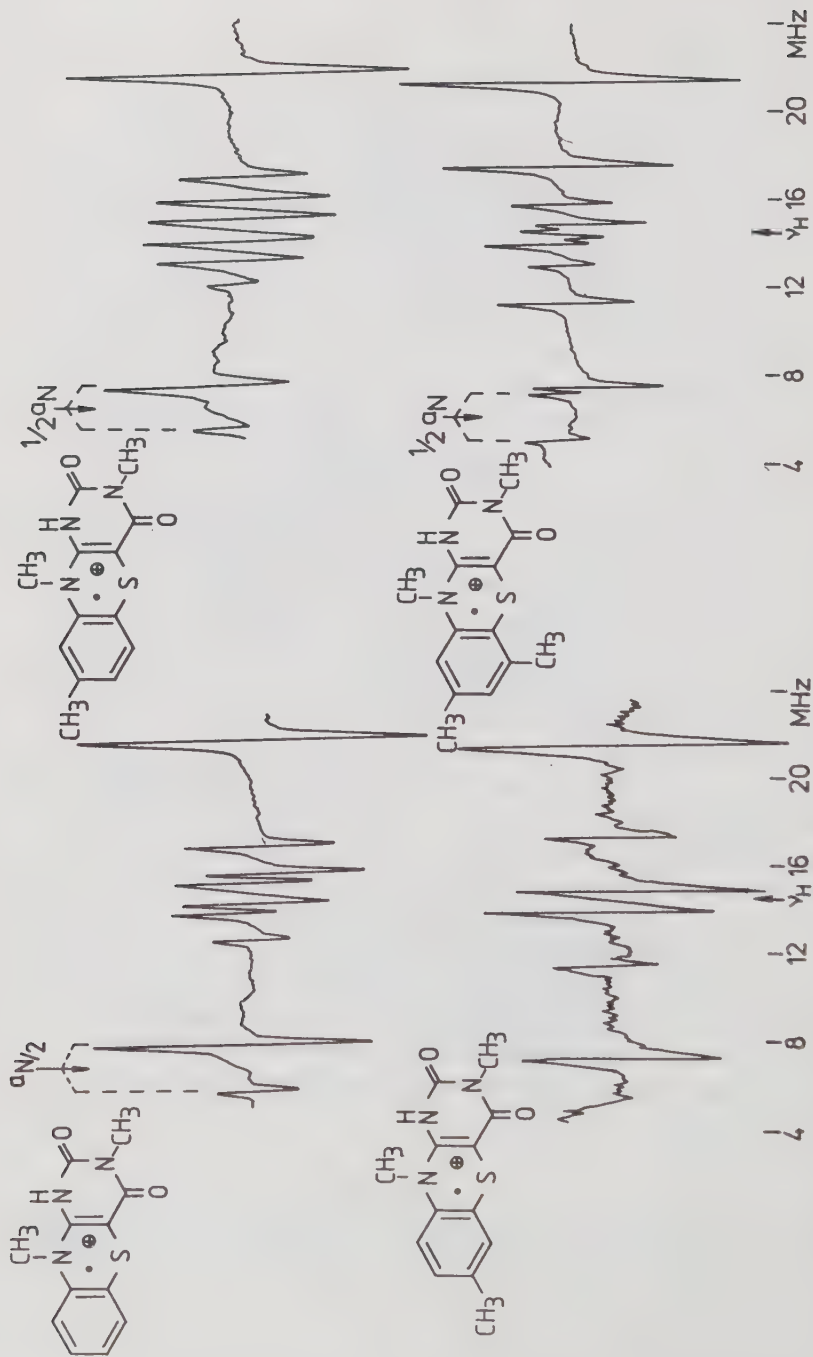


Abbildung 50. EPR-Spektren der Kationradikale 10a^{•+}, 10b^{•+}, 10c^{•+} und 10d^{•+} in Toluol/CF₃COOH bei 260 K

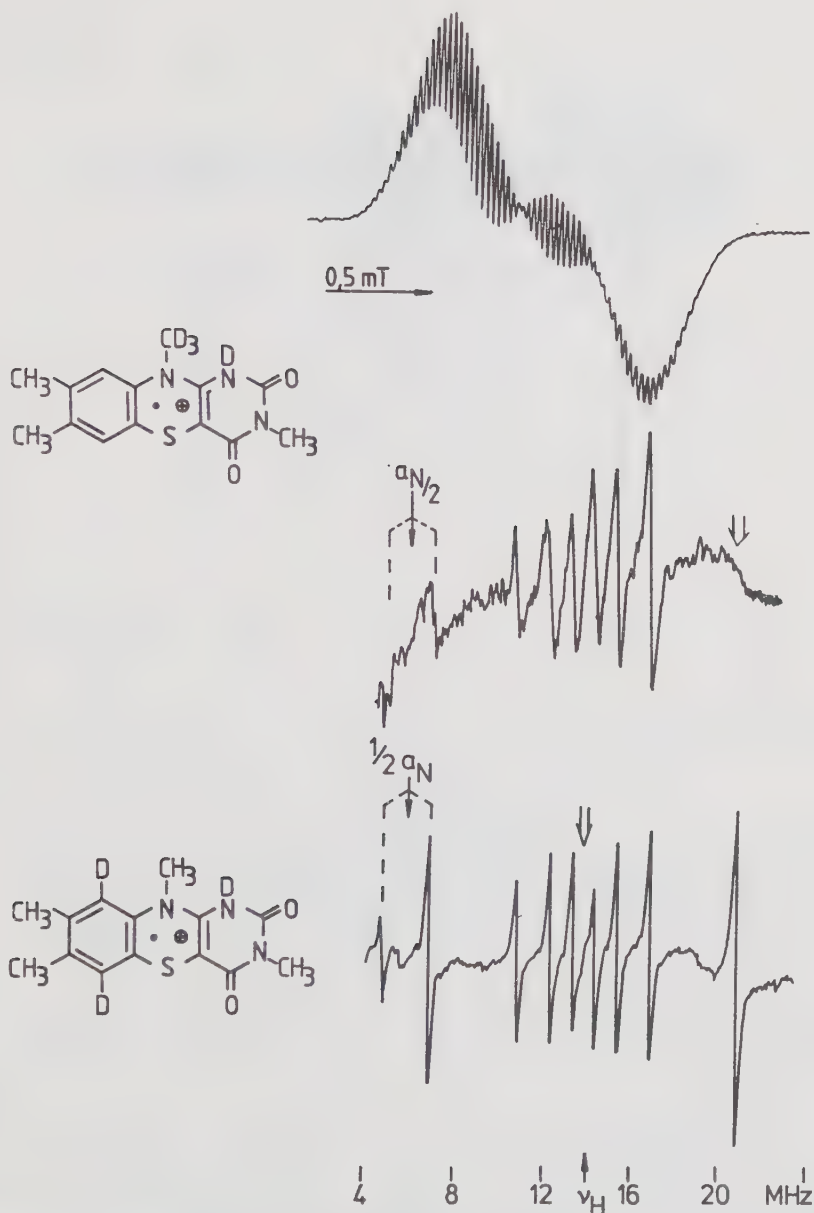


Abbildung 51. EPR- und ENDOR-Spektren der Kationradikale 10g^{•+} und 10h^{•+} in Toluol/CF₃COOH bei 260 K

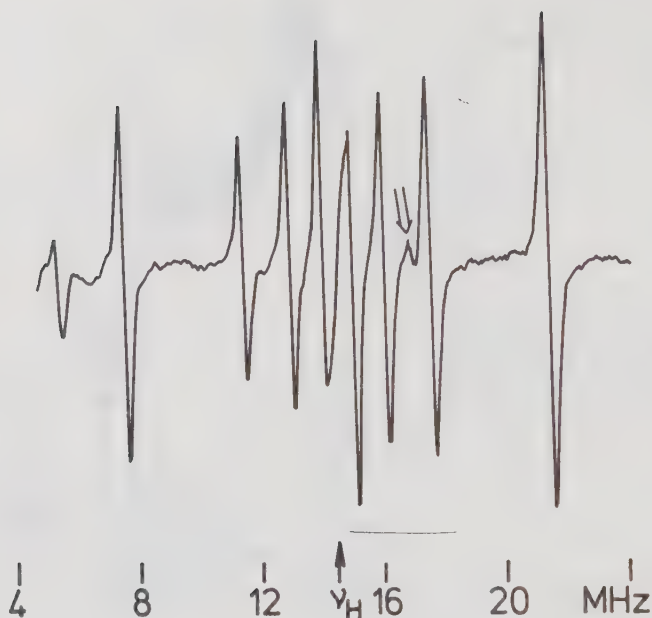


Abbildung 52. ENDOR-Spektrum des Kationradikals $10e^{\bullet+}$ mit einer meßbaren Verunreinigung durch das 6,7-Dimethyl-Isomere $10v^{\bullet+}$ (s. Pfeil für die 8-H-Kopplung)

Somit ergeben sich entgegen den EPR-Ergebnissen der Literatur andere Zuordnungen der Kopplungskonstanten für die Positionen 7, 6, 9 und 3, was aber durch die experimentellen Befunde sichergestellt werden konnte (Tab. 17). Im übrigen sind die g-Faktoren der Thiaflavin-Kationradikale gegenüber denen der Flavin-Kationradikale größer (Tab. 18). Die Simulation des EPR-Spektrums von $10e^{\bullet+}$ mit den im ENDOR-Experiment gefundenen Kopplungen läßt gute Übereinstimmung mit dem experimentellen erkennen.

Die Neutralradikale ergeben teilweise erheblich besser aufgelöste EPR-Spektren wie z. B. $10e^{\bullet+}$ in Chloroform (Abb. 53). Man kann immer die sechs Hauptgruppen erkennen. Somit muß sich in Position 10 eine Methylgruppe befinden. Die ENDOR-Spektren der aus den Dimeren dargestellten Neutralradikale sind ebenfalls

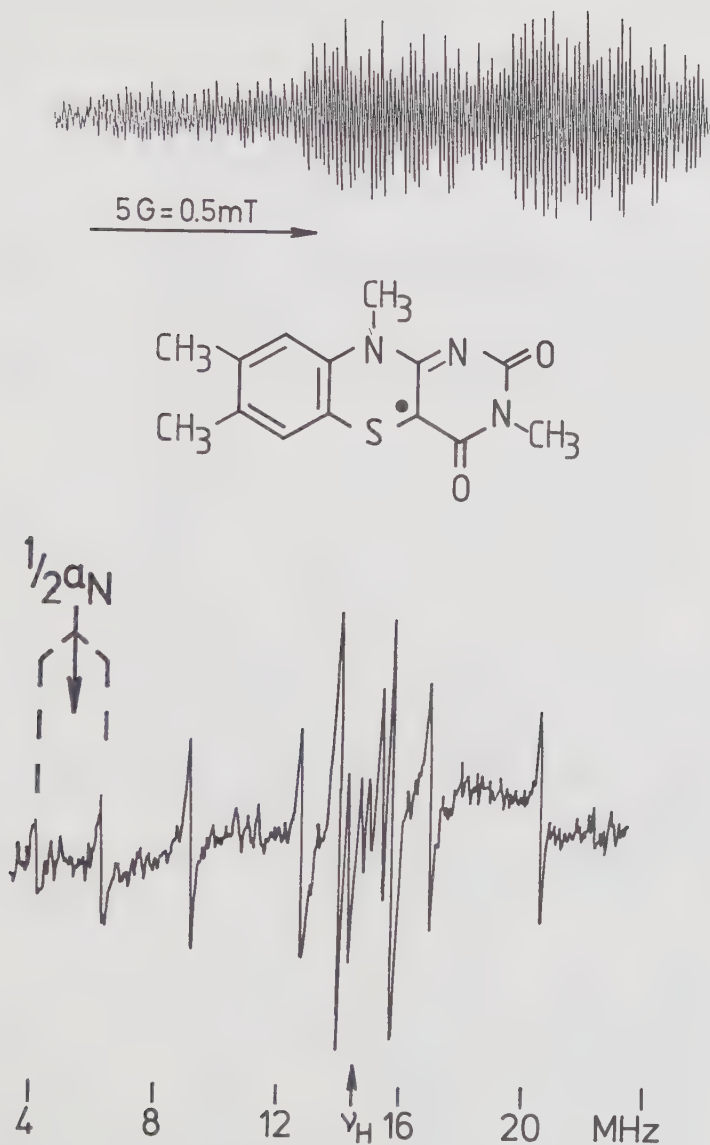


Abbildung 53. EPR-Haibspektrum und ENDOR-Spektrum von $10e^\bullet$ in CHCl_3 bei 260 K

Tabelle 17. Isotrope Kopplungskonstanten der Thiaisoalloxazin-Radikale, [MHz] $\pm 0,02$ MHz

Nr.	a_3^H	a_6^H	a_7^H	a_8^H	a_{10}^N	a_{10p}^H
<u>10a$\cdot^+$</u>	+0,90		-1,81	-4,30	13,07	+14,14 ^A
	+0,96		-1,85	-4,13	13,32	+14,38 ^B
					12,61	12,61 ^C
<u>10b$\cdot^+$</u>	+1,06		+2,80	-4,88	13,34	+14,32 ^A
<u>10c$\cdot^+$</u>	1,02		-1,82	+5,78	13,14	+14,29 ^A
<u>10d$\cdot^+$</u>	+0,98	-0,36	-2,78	+6,17	12,80	+13,90 ^A
<u>10e$\cdot^+$</u>	+1,06	0,32	+3,18	+6,30	13,08	+14,06 ^A
	+1,15	+0,20	+2,79	+5,51	12,98	+14,17 ^D
<u>10g$\cdot^+$</u>	1,00	-	3,12	6,10	13,10	14,14 ^E
<u>10h$\cdot^+$</u>	0,98		3,12	6,18	12,74	2,18 ^E
<u>10v$\cdot^+$</u>	1,06		3,18	5,40	13,08	14,06 ^A
<u>10a$\cdot$</u>	0,56		1,94	3,38	9,58	11,12 ^F
<u>10d$\cdot$</u>	1,31	0,18	1,84	4,24	9,60	11,49 ^F
<u>10e$\cdot$</u>	+0,87	+0,27	+1,78	+4,29	10,04	+11,67 ^F
		2,24		3,36	10,09	10,09 ^G

A Diese Arbeit, ENDOR in Toluol/CF₃COOH, 260 K

B Literaturstelle /115/, ENDOR in Nitromethan/H₂SO₄, 260 K

C Literaturstelle /107/, EPR in CF₃COOH

D Literaturstelle /115/, ENDOR in Nitromethan/AlCl₃, 260 K

E Diese Arbeit, ENDOR in Toluol/CF₃COOH, bei 10h $\cdot^+$ a_{10}^H ist Deuteriumkopplung

F Diese Arbeit, ENDOR in CHCl₃, 260 K

G Literaturstelle /58/, EPR in CHCl₃

Tabelle 18. g-Faktoren einiger Kationradikale

Nr.	Lösungsmittel	g-Faktor (unkorr.)
<u>7b$\cdot^+$</u>	CF ₃ COOH/Toluol	2,00356
<u>10b$\cdot^+$</u>	CF ₃ COOH/Toluol	2,00607
<u>10e$\cdot^+$</u>	CF ₃ COOH/Toluol	2,00634

meist besser aufgelöst als die der Kationradikale, zeigen aber oft ein schlechteres Signal-Rausch-Verhältnis (s. Abb. 53). Nach Oxidation eines Thiaflavins mit Bleidioxid in Toluol/DMSO erhält man infolge der sehr geringen Radikalkonzentration noch schwächere Signale. Aus den Mehrfachresonanz-Experimenten ergeben sich wieder fünf Protonen- und eine Stickstoffkopplung mit ihren relativen Vorzeichen (Tab. 17).

Veränderungen des Methylsubstituenten in Position 8 führt zu den ENDOR-Spektren wie in Abbildung 54. Die entsprechenden Kopplungen werden analog den Thiaflavin-Kationradikalen den Molekülpositionen zugeordnet und sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19. Isotrope Kopplungskonstanten einiger Thiaisoalloxain-Kationradikale in $\text{CF}_3\text{COOH/Toluol}$, 260 K, [MHz]

Nr.	a_3^H	a_6^H	a_7^H	a_8^H	a_{10}^N	$a_{10\beta}^H$
<u>$10k^{\bullet+}$</u>	+1,98	+0,76	+5,06		12,10	+13,45
<u>$10l^{\bullet+}$</u>	+0,85	+0,41	+3,16	-1,25	12,68	+13,82

Ribityl-Thiaflavin und Modellverbindungen:

Die EPR-Spektren dieser Kationradikale sind nicht ohne weiteres auswertbar. In den ENDOR-Experimenten erhält man bis zu sechs Protonen- und eine Stickstoffkopplung, bzw. beim Tetraacetyl-Ribityl-Thiaflavin-Kationradikal $10q^{\bullet+}$ sogar acht Protonenkopplungen (Abb. 55 und 56, Tab. 20). Die große Kopplung von 14 MHz für Position 10 ist nicht mehr vorhanden. Dafür treten zwei Kopplungen von etwa 8 MHz bei $10o^{\bullet+}$, $10n^{\bullet+}$ und $10q^{\bullet+}$ mit positivem Vorzeichen auf. Die beiden β -Protonen des sperrigen Substituenten in Position 10 sind demnach nicht mehr äquivalent, der Substituent kann nicht mehr ungehindert um die N-CH-Bindungsachse rotieren.

Das nach Fenner et al /59/ erhaltene Tetraacetyl-Ribothiaflavin ist laut NMR-Untersuchungen (3.3.2.) ein Gemisch aus zwei Isomeren, das sich sogar durch HPLC nicht auftrennen läßt. Aus diesem Grunde treten im ENDOR-Spektrum (Abb. 56) der Radikale mehr Linien auf als erwartet. Erst durch General TRIPLE läßt sich die Zuordnung der Kopplungen zu den beiden

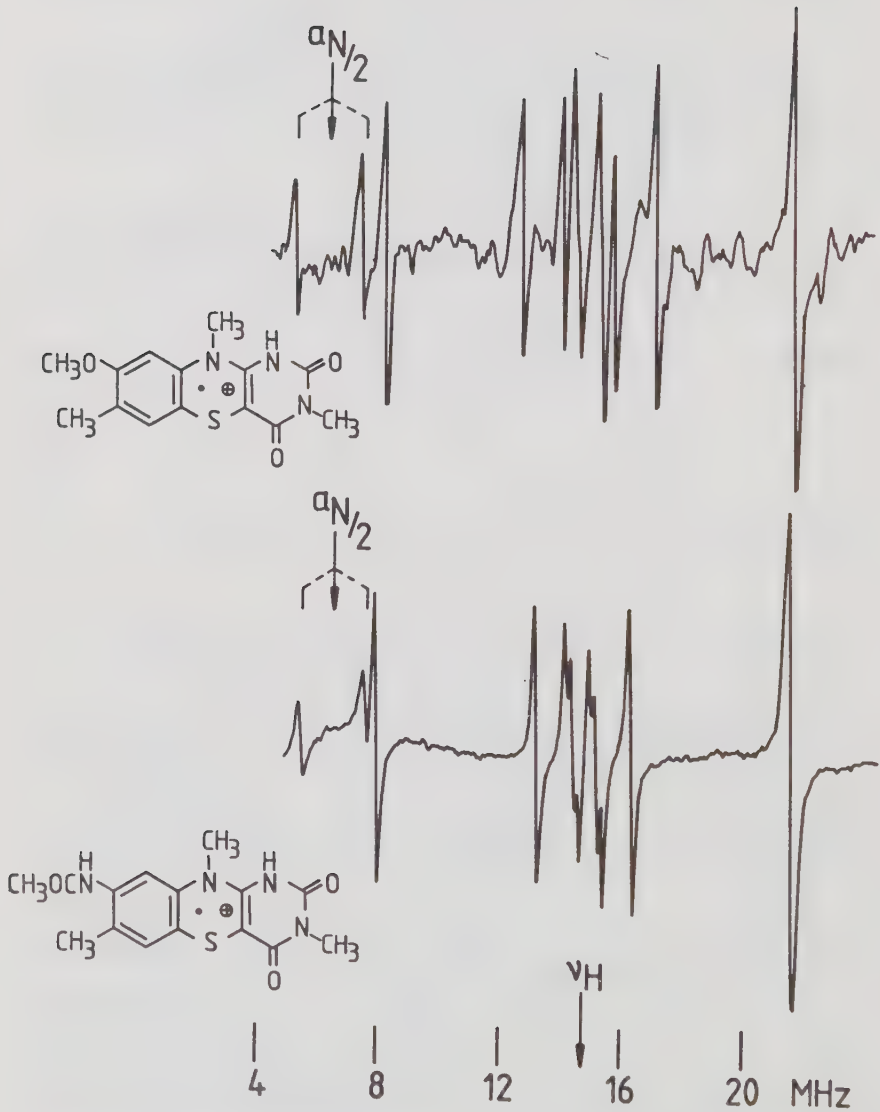


Abbildung 54. ENDOR-Spektren der Kationradikale 10k•+ und 10l•+ in Toluol/CF₃COOH bei 260 K

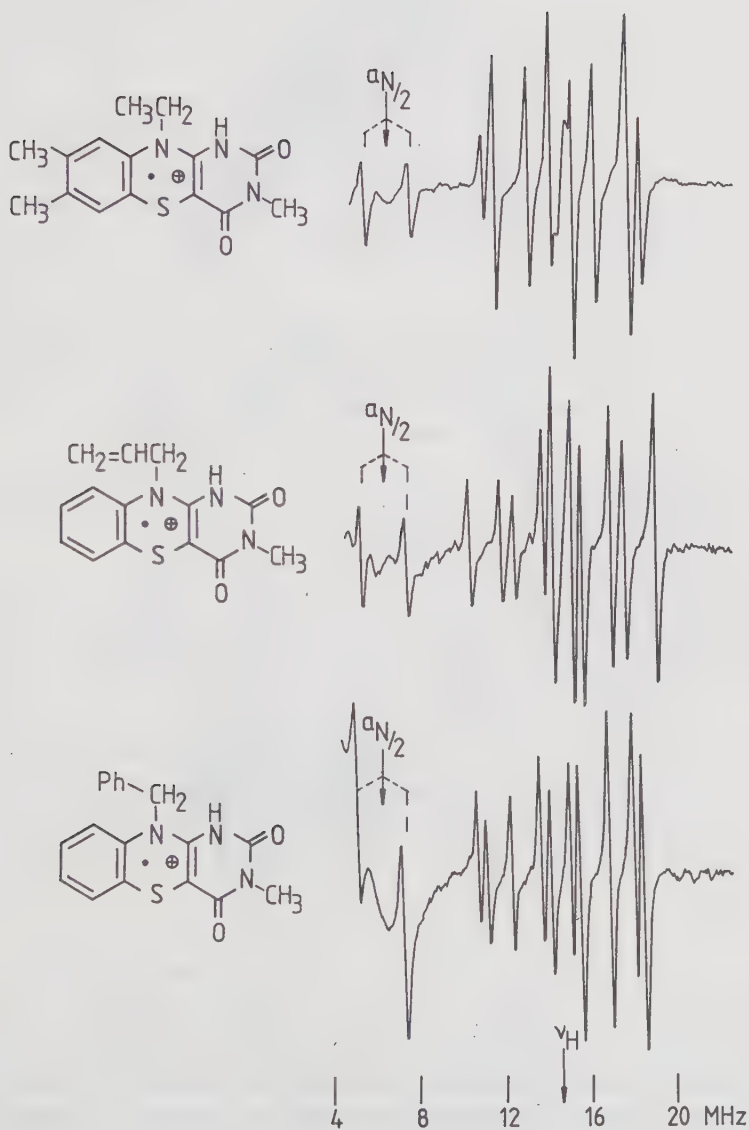


Abbildung 55. ENDOR-Spektren der Kationradikale $10m^{\bullet+}$, $10n^{\bullet+}$ und $10o^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH bei 280 K

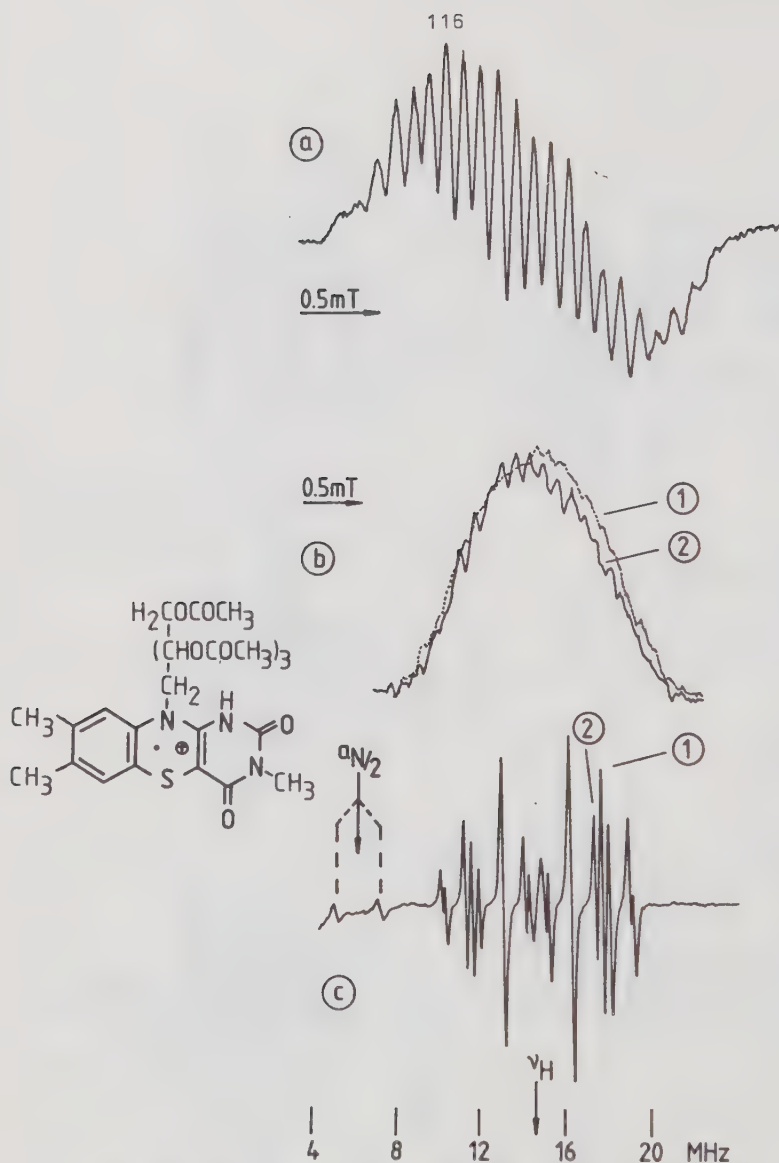


Abbildung 56. a) EPR-Spektrum von $10a^{\bullet+}$ in Toluol/ CF_3COOH
 b) EIE-Spektren der beiden Isomeren (s. Text)
 bei Positionierung 1 oder 2 im ENDOR-Spektrum
 c) ENDOR-Spektrum von $10a^{\bullet+}$ (mit $10w^{\bullet+}$) in
 Toluol/ CF_3COOH bei 280 K

verschiedenen Spezies durchführen. Nach Vergleich mit dem 6,7-Dimethyl-Isomeren des Thialumiflavin-Kationradikals muß die Kopplung von $-5,4$ MHz dem α -Proton in Position 8 von $10w^{*+}$ zugeschrieben werden. Alle anderen Linien im ENDOR-Spektrum, die auf die Einstrahlung einer Frequenz zu dieser Kopplung mit Intensitätsänderung reagieren, können ebenfalls diesem Isomeren zugeordnet werden. Die kleinen Kopplungen sind bei beiden Radikalen gleich. Die entsprechenden EIE-Spektren zeigen allerdings nur geringe Unterschiede in den Gesamtaufspaltungen, da nur ein Unterschied von 1 G zu erwarten ist (Abb. 56b).

Kopplungskonstanten aus der Literatur existieren nur von EPR-Untersuchungen an $10n^{*+}$ von Grauert /57/. Seine Erwartung, daß die Methylenprotonen in Position 10 inäquivalent sind, kann also mit den ENDOR-Spektren bestätigt werden.

Tabelle 20. Isotrope Kopplungskonstanten von Thiariboflavin-Kationradikalen und Modellradikalen in CF_3COOH /Toluol, 260 K, [MHz] $\pm 0,02$ MHz

Nr.	a_3^H	a_6^H	a_7^H	a_8^H	a_{10}^N	$a_{10\beta}^H$
$10m^{*+}$	+1,04	0,50	+3,12	+6,28	13,04	+7,40
$10n^{*+}$	+0,92	0,28	-1,82	-4,59	12,50	7,73/6,88
					13,17	13,17/5,61 ^A
$10o^{*+}$	+0,91		-1,82	-4,53	12,60	+8,73/+5,81
$10q^{*+}$	+1,12	+0,60	+3,13	+6,74	12,42	+9,02/+6,04
$10w^{*+}$	+1,12	+0,60	+3,13	-5,36	12,42	+8,60/+6,74

^A Literaturstelle /107/, EPR in CF_3COOH

3.3.3.2. Messungen an gefrorenen Lösungen

Messungen an gefrorenen Lösungen der Radikale bei etwa 130 K (Wasser) oder 110 K (organische Lösungsmittel) lassen sich leichter durchführen, als die an isotropen flüssigen Lösungen. Mikrowellendämpfung der Lösungsmittel und eingeschlossener Sauerstoff beeinflussen kaum mehr die Signalintensitäten und

Linienbreiten. Es können größere Probenvolumina eingesetzt werden, die Mikrowellenleistung kann geringer sein (etwa 12 mW) und das Signal-Rausch-Verhältnis ist im allgemeinen um Größenordnungen besser.

Die EPR-Spektren sämtlicher gefrorener Radikallösungen sind infolge der nicht mehr ausgemittelten Anisotropie unaufgelöst. Sie bestehen aus einer relativ breiten Linie, die an den Flanken unsymmetrische Verbreiterungen aufweist.

In den ENDOR-Spektren treten im allgemeinen drei verschiedene Arten von Absorptionssignalen auf:

a) Matrix-Signale

Bei den Messungen in wäßrigen Lösungsmitteln (HCl, NaOH, H₂O) erscheint die intensivste Linie bei der freien Protonenfrequenz von 14,5 MHz (Abb. 57). Ihre Amplitude ist abhängig von der Radikalkonzentration, der Meßtemperatur und der Mikrowellensättigung. In deuterierten Lösungsmitteln (DCl) erhält man ein entsprechendes Matrix-Signal bei der Kernfrequenz für Deuterium (2,6 MHz). Die Protonenlinie verschwindet trotz hohem Deuterierungsgrades (99,9% D) des Lösungsmittels nicht völlig, sie ist nur schmaler (etwa 100 KHz) und intensitätsschwächer als in HCl (etwa 300 KHz Linienbreite). Das ENDOR-Experiment der Radikale in Toluol/Trifluoressigsäure ergibt außer einem Protonensignal auch eine Absorption bei der freien Fluorfrequenz von 13,7 MHz. Da dieses bei Ersatz der Trifluoressigsäure durch Trichloressigsäure wegfällt, kann es als Fluor-Matrixsignal identifiziert werden.

Die Intensitäten der Matrixsignale für Protonen und Fluor- atome hängen unterschiedlich von der Temperatur und der Mikrowellenleistung ab (Abb. 58). So wird eine maximale Amplitude der Protonenlinie in HCl oder Wasser bei 130 K erreicht. Das Fluor-Matrix-Signal zeigt in diesem Temperaturbereich ein Minimum und steigt zu höheren Temperaturen stark an. Für das Protonensignal in CF₃COOH/Toluol ist nur ein leichter Intensitätsanstieg zwischen 130 K und 150 K zu erkennen.

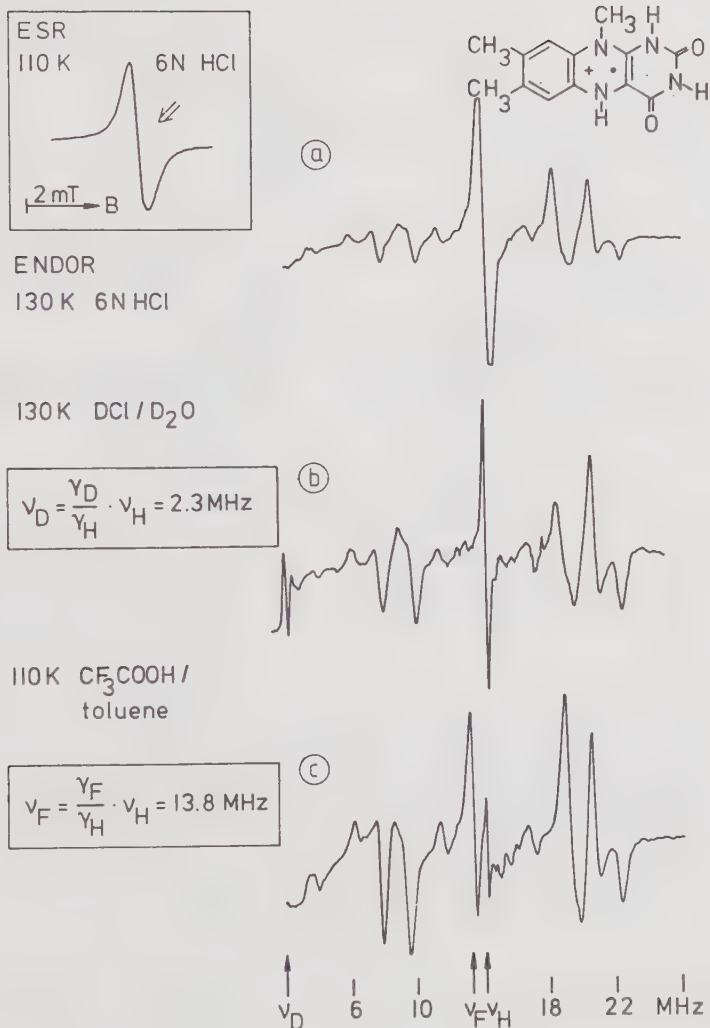


Abbildung 57. ENDOR-Spektren von $7e^{\bullet+}$ in

a) HCl bei 130 K

b) DCl bei 130 K

c) Toluol/CF₃COOH bei 110 K

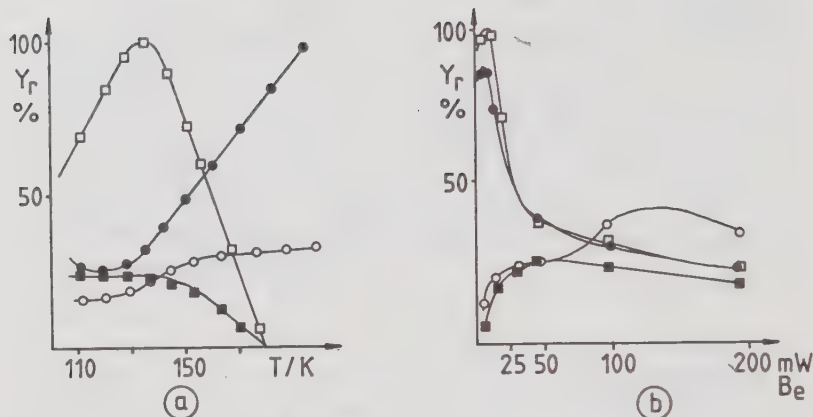


Abbildung 58. Relative ENDOR-Signalamplituden in Abhängigkeit von der Temperatur (a) und Mikrowellenleistung (b)

■ = Methylsignale ; ● = Fluor-Matrixsignal
 □ = Protonen-Matrixsignal ; ○ = Protonen-Matrixsignal in CF_3COOH

Auch die optimale Mikrowellensättigung ist für diese Kerne unterschiedlich (Abb. 58b). So ist bei etwa 15 mW ein Maximum der ENDOR-Amplitude der Matrixlinien von Protonen in HCl und Fluorkerne in CF_3COOH /Toluol zu erkennen. Die Kurve für das Protonen-Matrix-Signal in Trifluoressigsäure/Toluol steigt zu höheren Mikrowellenleistungen leicht an, zeigt aber bei etwa 80 mW einen Wendepunkt.

b) Methyl-Signale

In den Festkörper-ENDOR-Spektren treten außerdem intensive Signale auf, die etwa bei den Werten für die isotropen Kopplungen von Methylprotonen liegen. Die Linien für die größeren Kopplungen können auch noch in zwei Komponenten aufgespalten sein. Ersetzt man eine Methylgruppe im Lumiflavin-Kationradikal durch ein Proton, so sind die ENDOR-

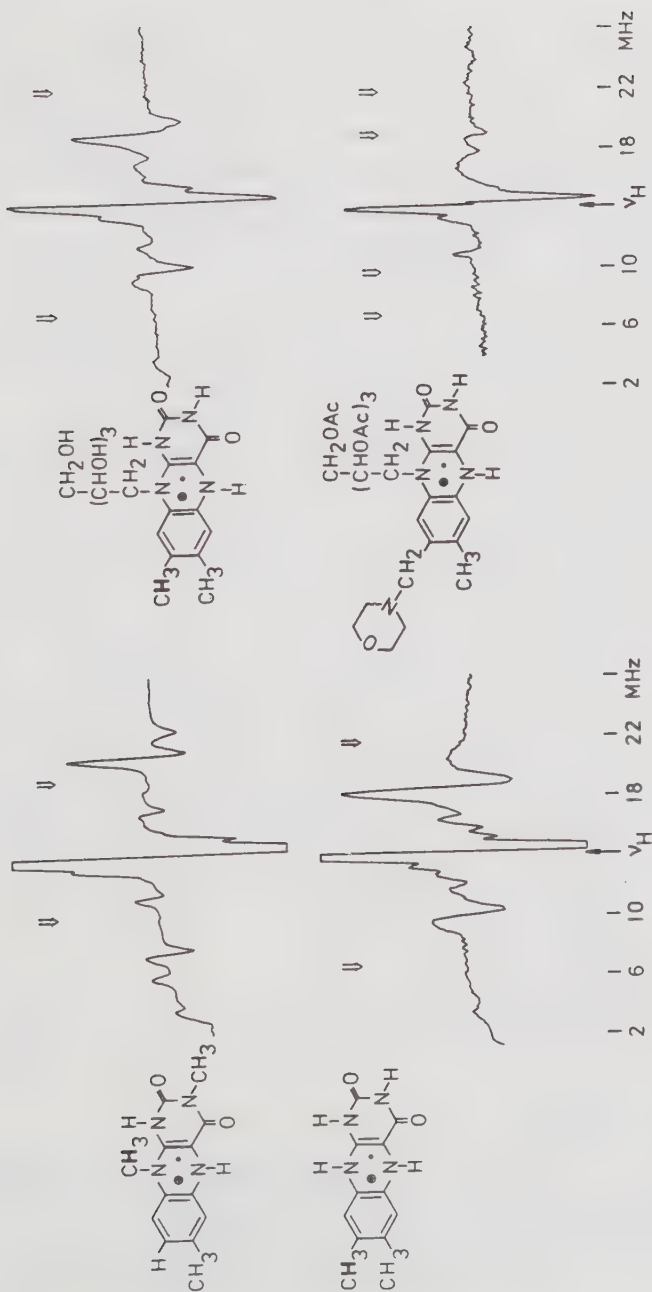


Abbildung 59. ESR-Spektren der Kationradikale $7p^{+\bullet}$, $7r^{+\bullet}$, $7b^{+\bullet}$ und $6e^{+\bullet}$ in gefrorener Salzsäure

Signale dieser Methylkopplung im Festkörper-Spektrum nicht mehr meßbar (s. Abb. 59a). Ebenso kann man diese Resonanzlinien nicht mehr registrieren, wenn die freie Rotation der Methylgruppe durch Vergrößerung des Substituenten wie im Riboflavin- oder 8 α -Morpholino-Tetraacetyl-Riboflavin-Kationradikal behindert wird (Abb. 59b). Somit können diese Kopplungen in gefrorener Lösung den Methylgruppen der Positionen 7, 8 und 10 im Flavin-Radikal zugeordnet werden.

Aufgrund der eingeschränkten Beweglichkeit der Radikale in gefrorenen Lösungen unterscheiden sich die Moleküle in ihren Orientierungen zum äußeren statischen Magnetfeld. Entsprechend können die verschiedenen HFS-Komponenten A_1 und $A_{||}$ gemessen werden. Dies erklärt die Aufspaltung der Methylsignale. Diese Signalform hängt von der Positionierung des Magnetfeldes im EPR-Spektrum ab. Die Sättigung des EPR-Zentrums ergibt aufgespaltene Methylsignale wie in Abb. 60a. Positionierung auf die Flanken des EPR-Signals, also auf die z-Komponenten der HFSCs, bedingt nur noch das Auftreten der intensiveren Komponente $A_{||}$ (kleinere Kopplung) im ENDOR-Spektrum (Abb. 60b). In der Diskussion wird ausführlich beschrieben, warum die größere Kopplung A_1 und die kleinere $A_{||}$ der Methylprotonen ist.

Im Festkörper-ENDOR-Spektrum des 10-CD₃-Lumiflavin-Kationradikals können die Protonensignale für die 10-Methylgruppe nicht mehr registriert werden. Dafür tritt im Deuteriumbereich ein hochfrequentes Signal für die Deuteriumkopplung auf, das ebenfalls eine Aufspaltung wie oben beschrieben erkennen läßt (Abb. 60c).

Im Übrigen zeigen die Intensitäten dieser Linien bei etwa 130 K und 50 mW Mikrowellenleistung ein Maximum und nehmen zu höheren Temperaturen und geringeren MW-Feldern stark ab (Abb. 58).

c) Signale anderer Kerne

Signale von α -Protonen und Stickstoffatomen sind intensitätsschwächer und meist durch extreme Linienbreiten nicht mehr nachweisbar. Hier konnte nur die α -Protonenkopplung des Wasserstoffatoms in Position 6 der Kationradikale erkannt.

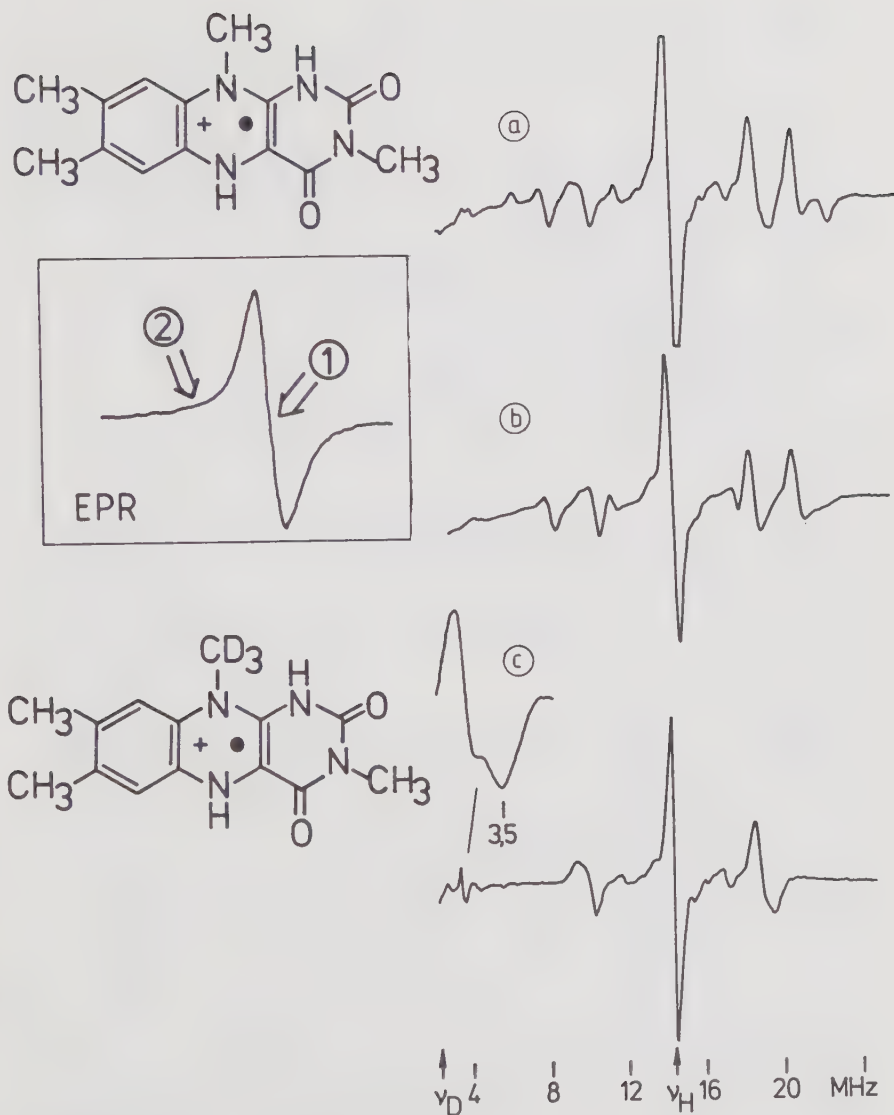


Abbildung 60. ENDOR-Spektren von

- a) $7e^{\bullet+}$ in HCl bei 130 K, EPR-Positionierung bei 1
- b) $7e^{\bullet+}$, EPR-Positionierung bei 2
- c) $7h^{\bullet+}$ in DCl bei 130 K

werden. Der Wegfall der entsprechenden Signale im Spektrum der entsprechend deuterierten Verbindung beweist diese Zuordnung. Eine Unterscheidung der HFS-Komponenten ist hier nicht möglich.

Ehrenberg und andere konnten die ersten ENDOR-Spektren in gefrorenen Lösungen registrieren und die ersten beiden Sorten von Signalen im hochfrequenten Bereich registrieren /41-49/. Allerdings konnten sie auch nur die Absorptionsspektren aufnehmen. Dies bedeutet einen Empfindlichkeitsverlust gegenüber dem Registrieren der ersten Ableitung, denn eine Aufspaltung der Methylsignale war bei ihnen nicht zu erkennen.

In Abbildung 61 sind die Festkörper-ENDOR-Spektren der beiden Thiaflavin-Kationradikale $10e^{*\cdot+}$ und $10a^{*\cdot+}$ dargestellt. Man erkennt bei $10e^{*\cdot+}$ außer den Matrixsignalen für Fluor und Wasserstoff im hochfrequenten Bereich die Protonensignale für drei Methylgruppen. Somit zeigt sich auch hier die Richtigkeit der Zuordnung einer großen Spindichte zu Position 7, wie dies aufgrund der ENDOR-Ergebnisse von flüssigen Radikallösungen geschehen ist. Zwei Methylprotonen-Kopplungen fallen weg, wenn die Methylgruppen der Positionen 7 und 8 wie in $10a^{*\cdot+}$ durch Protonen ersetzt sind.

Abbildung 62 zeigt die deutliche Änderung von Methylprotonen-Kopplungen auch im Festkörper, wenn durch Variation des pH-Wertes zu anderen Protonierungszuständen der Radikale übergegangen wird. So ist der HFS-Wert für die Protonen in Position 8 des FMN-Radikals im Anionradikal am größten (10 MHz). Er nimmt nach einer Protonierung der Position 5 ab. Der geringste Wert wird für das Neutralradikal registriert (7 MHz), während im Kationradikal immerhin noch eine Kopplung von 9 MHz gemessen werden kann. Ähnlich sollten die HFS-Daten der entsprechenden protonierten Coenzymradikale in den Proteinen sein.

Aus den Tabellen 21 und 22 geht hervor, daß die Lösungsmittel ebenfalls großen Einfluß auf die Kopplungen haben. Dies kann gut am Lumiflavin-Kationradikal studiert werden. Wieder reagiert die HFSC der Position 8 am stärksten. Man erkennt den größten Wert in Trifluoressigsäure/Toluol. In Trichloressigsäure/Toluol ist er um 0,6 MHz kleiner. Weiterhin ist ein Abnehmen dieser

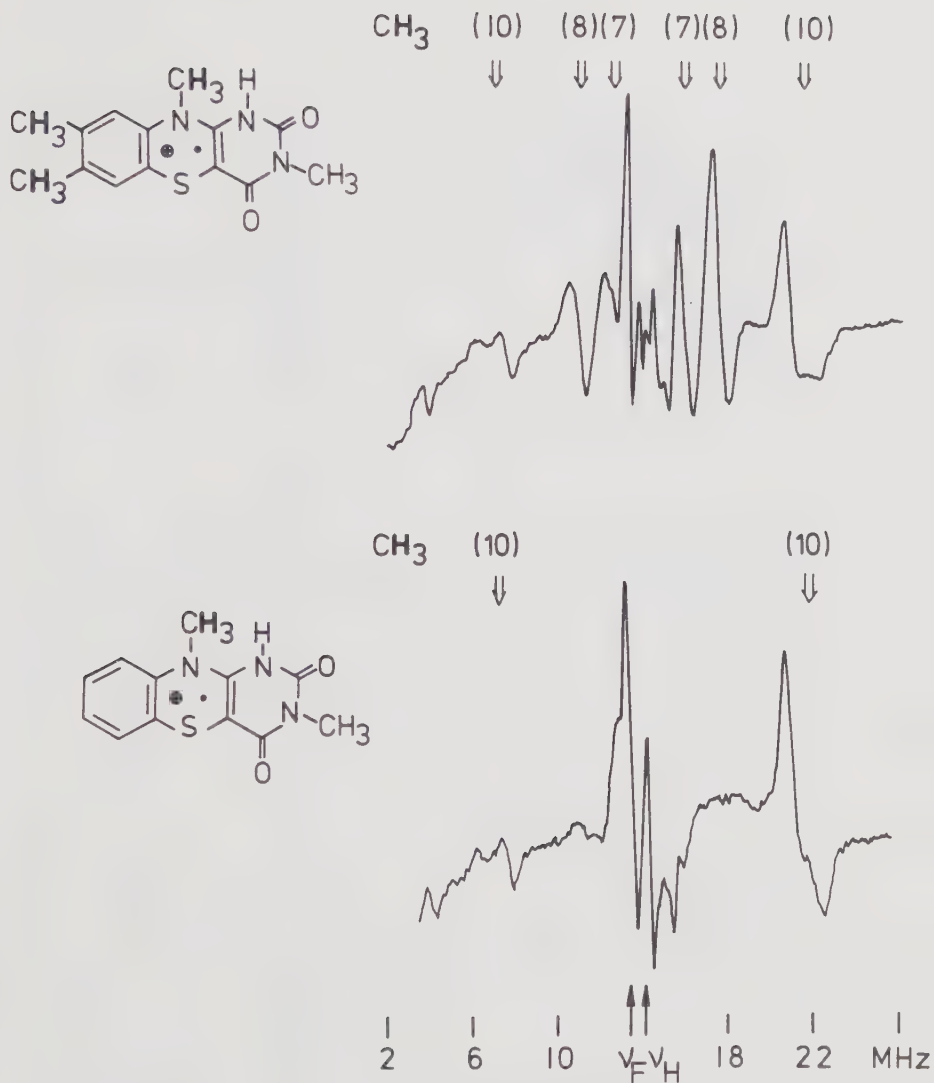
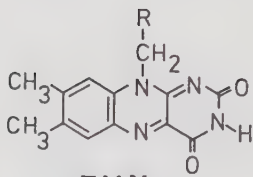


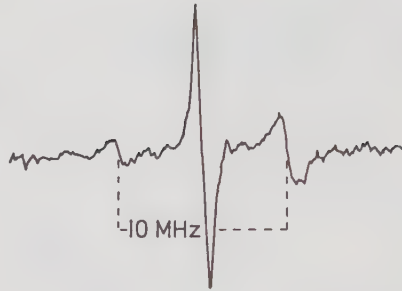
Abbildung 61. ENDOR-Spektren von **10a^{•+}** und **10e^{•+}** in Toluol/
CF₃COOH bei 110 K

**FMN**

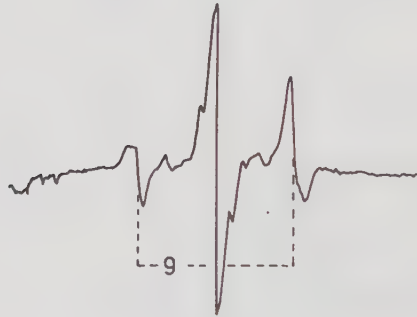
Anion-Radikal
H₂O/NaOH

ENDOR

130 K



Kation-Radikal
H₂O/HCl



Neutral-Radikal
H₂O (p_H = 7)

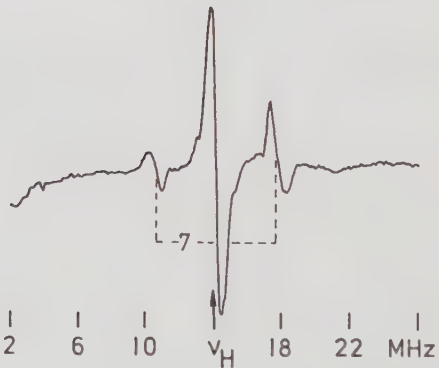


Abbildung 62. ENDOR-Spektren der verschieden protonierten FMN-Radikale

Tabelle 21. Kopplungskonstanten eines Phenazin-, der Alloxazin- und der Isoalloxazin-Radikale
in gefrorenen Lösungen, 110 – 130 K, [MHz] $\pm$ 0,1 MHz

Nr.	$a_{CH_3 I}^H (10)$	$a_{CH_3 II}^H (10)$	$a_{CH_3}^H (10)_{iso}^A$	$a_{CH_3 I}^H (8)$	$a_{CH_3 II}^H (8)$	$a_{CH_3}^H (8)_{iso}^A$	$a_{CH_3}^H B(x)$	$a_H^H (6)$	Lösungsm.
$6b^{*+}$	-	-	-	-	-	-		5,1	HCl
$6c^{*+}$	-	-	-	9,9	8,3	8,8		5,7	DCI
$6d^{*+}$	-	-	-	9,4	8,1	8,5	3,5(6)		DCI
$6e^{*+}$	-	-	-	9,8	8,6	9,0	1,8(7)	4,8	HCl
$6g^{*+}$	-	-	-	9,9	8,6	9,0	1,8(7)		DCI
$7a^{*+}$	16,6	13,2	14,3	-	-	-		6,1	DCI
$7b^{*+}$	16,7	13,0	14,2	-	-	-	2,0(7)	5,7	HCl
$7c^{*+}$	16,2	12,6	13,8	10,1	8,4	9,0		6,4	HCl
$7d^{*+}$	15,9	12,8	13,8	10,2	8,0	8,7	3,3(6)	4,5	HCl
$7e^{*+}$	16,6	13,0	14,2	10,7	9,0	9,6	1,9(7)	5,5	HCl
	16,4	13,0	14,1	11,4	9,8	10,3		5,4	CF ₃ COOH/Tol.
	16,5	13,2	14,3	10,8	9,4	9,9		5,4	CCl ₃ COOH/Tol.
$7g^{*+}$	16,5	13,1	14,2	10,5	8,9	9,4	1,9(7)	-	DCI
$7h^{*+}$	2,5 ^C	2,1 ^C	2,2 ^C	10,5	8,7	9,3		5,4	DCI
$7p^{*+}$	-	-	-	10,9	9,2	9,8	1,9(7)	5,6	HCl
$7r^{*+}$	-	-	-	-	-	-		6,6	HCl
$7t^{*+}$	-	-	-	10,7	9,0	9,6	1,9(7)	5,5	HCl
$7u^{*+}$	-	-	-	11,7	10,2	10,7	1,5(7)	5,5	CF ₃ COOH/Tol.

Fortsetzung S. 128

<u>7v•</u>	14,7	11,5	12,5	9,0	7,8	8,2	5,6	CHCl ₃ ^D
<u>7v•</u>	13,6	10,7	11,7	8,3	6,7	7,2	5,2	CHCl ₃ ^E
<u>7t•</u>	-	-	-	9,1	7,0	7,7	2,2	pH = 7
<u>7u•</u>	-	-	-	9,8	7,4	8,2		pH = 7
<u>7v•-</u>	12,4	9,4	10,4	10,9	10,3	10,5	1,6(7)	THF ^F
<u>7t•-</u>	-	-	-	12,7	9,9	10,8		0,1 N NaOH
<u>7u•-</u>	-	-	-	12,0	10,6	11,5		0,1 N NaOH
<u>12•+</u>	21,3	17,1	18,5					CF ₃ COOH

A Isotrope HFSCs errechnet nach $a_{\text{iso}} = 1/3 (A_{\text{I}} + 2A_{\text{H}})$

B Kopplungskonstante der Methylprotonen in Position x

C Deuteriumkopplung

D Neutralradikal mit Proton in Position 5

E Neutralradikal mit Methylgruppe in Position 5; $a_{\text{CH}_3}^{\text{H}}(5) = 21,4 \text{ MHz}$

F Das Anionradikal wurde durch Reduktion mit Phenylmagnesiumbromid dargestellt; eine Komplexierung des Radikals durch Metallionen ist zu vermuten; die Zuordnung ist nicht bewiesen

Tabelle 22. Kopplungskonstanten der Thiaisoalloxazin-Radikale in gefrorenen Lösungen,
110 – 130 K, [MHz] $\pm$ 0,1 MHz

Nr.	$a_{\text{CH}_3}^{\text{H}}$ (10) _I	$a_{\text{CH}_3}^{\text{H}}$ (10) _{II}	$a_{\text{CH}_3}^{\text{H}}$ (10)iso	$a_{\text{CH}_3}^{\text{H}}$ (8) _I	$a_{\text{CH}_3}^{\text{H}}$ (8) _{II}	$a_{\text{CH}_3}^{\text{H}}$ (8)iso	$a_{\text{CH}_3}^{\text{H}}$ (7) _I	$a_{\text{CH}_3}^{\text{H}}$ (7) _{II}	$a_{\text{CH}_3}^{\text{H}}$ (7)iso	Lösungsm.
<u>10a⁺</u>	16,7	13,4	14,5	–	–	–	–	–	–	CF ₃ COOH
<u>10c⁺</u>	16,2	13,4	14,3	7,6	6,3	6,7	–	–	–	CF ₃ COOH
<u>10d⁺</u>	16,2	13,3	14,2	7,3	6,0	6,4	–	–	–	CF ₃ COOH
<u>10e⁺</u>	16,4	13,1	14,2	8,0	6,3	6,9	4,5	2,9	3,4	CF ₃ COOH
<u>10h⁺</u>	3,8 ^B	2,2 ^B	2,7 ^B	7,5	6,6	6,9	4,3	3,3	3,6	CF ₃ COOH
<u>10g⁺</u>	–	–	–	7,9	6,8	7,2	3,9	3,1	3,4	CF ₃ COOH
<u>10d[•]</u>	12,4	10,8	11,3	4,6	4,0	4,2	–	–	–	Durol

A Isotrope HFSCs errechnet nach $a_{\text{iso}} = 1/3 (A_{\text{I}} + 2A_{\text{II}})$
B Deuteriumkopplung

Kopplung in DC1 und HCl zu registrieren. Inwieweit die Säurestärke der benutzten Säure hierfür verantwortlich ist, wird in 4.3.1. noch diskutiert werden.

Die isotropen Kopplungskonstanten, die durch ENDOR-Messungen an den flüssigen Lösungen erhalten wurden, unterscheiden sich von den Werten der Matrix-ENDOR-Experimente. Dies wird besonders bei den Thiaflavin-Kationradikalen deutlich.

Enzyme

a) Old Yellow Enzyme

Von diesem Enzym konnten sowohl ein EPR-Spektrum in isotroper flüssiger (s. Abb. 45) als auch in gefrorener Lösung aufgenommen werden, die sich aber in ihren Auflösungen nicht unterscheiden. Das ENDOR-Spektrum in gefrorener Lösung zeigt ein intensives Matrixsignal, zwei aufgespaltene Methylsignale und mehrere kleine Kopplungen in der Nähe des Matrixsignals (Abb. 63). Wieder läßt sich die zweite HFS-Komponente für die Methylgruppe durch Positionierung auf den EPR-Flanken nicht mehr nachweisen. Zum Vergleich mit dem entsprechenden Coenzym-Radikal ist das ENDOR-Spektrum des FMN-Anionradikals ebenfalls in Abbildung 63 wiedergegeben, das eine größere Linienbreite des Methylsignals zeigt.

b) Flavodoxine

Die sehr stabilen blauen Radikale der Flavodoxine von *Azotobacter vinelandii* und *Megasphaera elsdenii* ergeben ENDOR-Spektren mit sehr guten Signal-Rausch-Verhältnissen (Abb. 64). Außer den Daten für Matrixprotonen und die 8-Methylgruppe lassen sich noch einige Kopplungen mit intensitätsschwächeren und breiten Linien nachweisen.

c) Methanol Oxidase

Nach der Isolierung dieses Enzyms aus *Candida boidinii* können Radikale im ENDOR-Spektrum nachgewiesen werden, ohne daß eine chemische oder photochemische Reduktion durchgeführt wurde. Man erhält ziemlich intensitätsschwache Matrixsignale, relativ

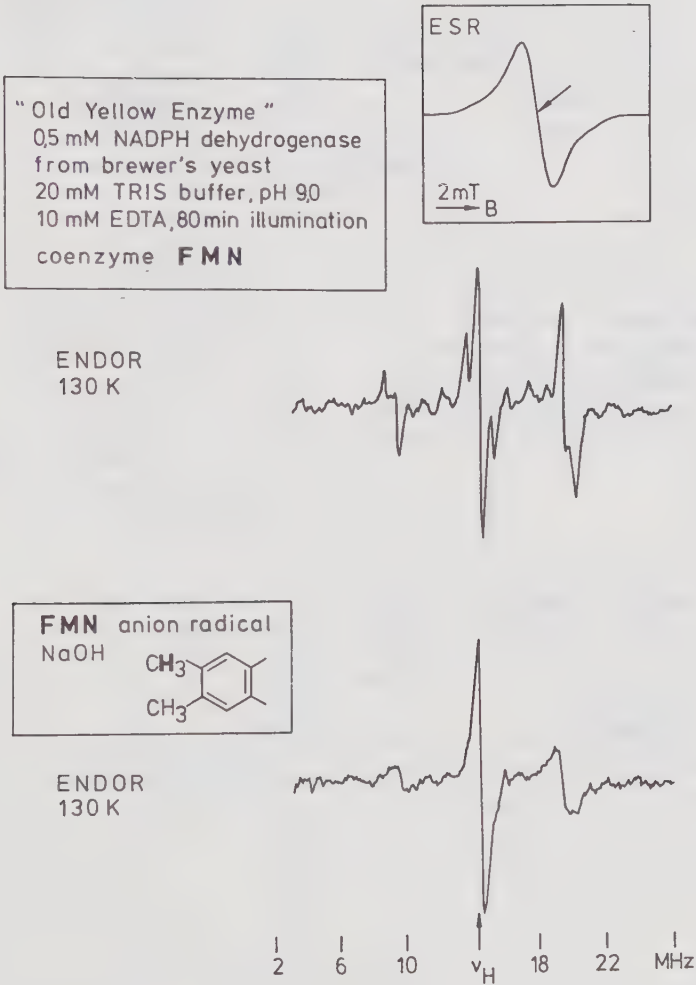


Abbildung 63. EPR- und ENDOR-Spektrum des Radikals der NADPH-Dehydrogenase sowie zum Vergleich das ENDOR-Spektrum des FMN-Anionradikals

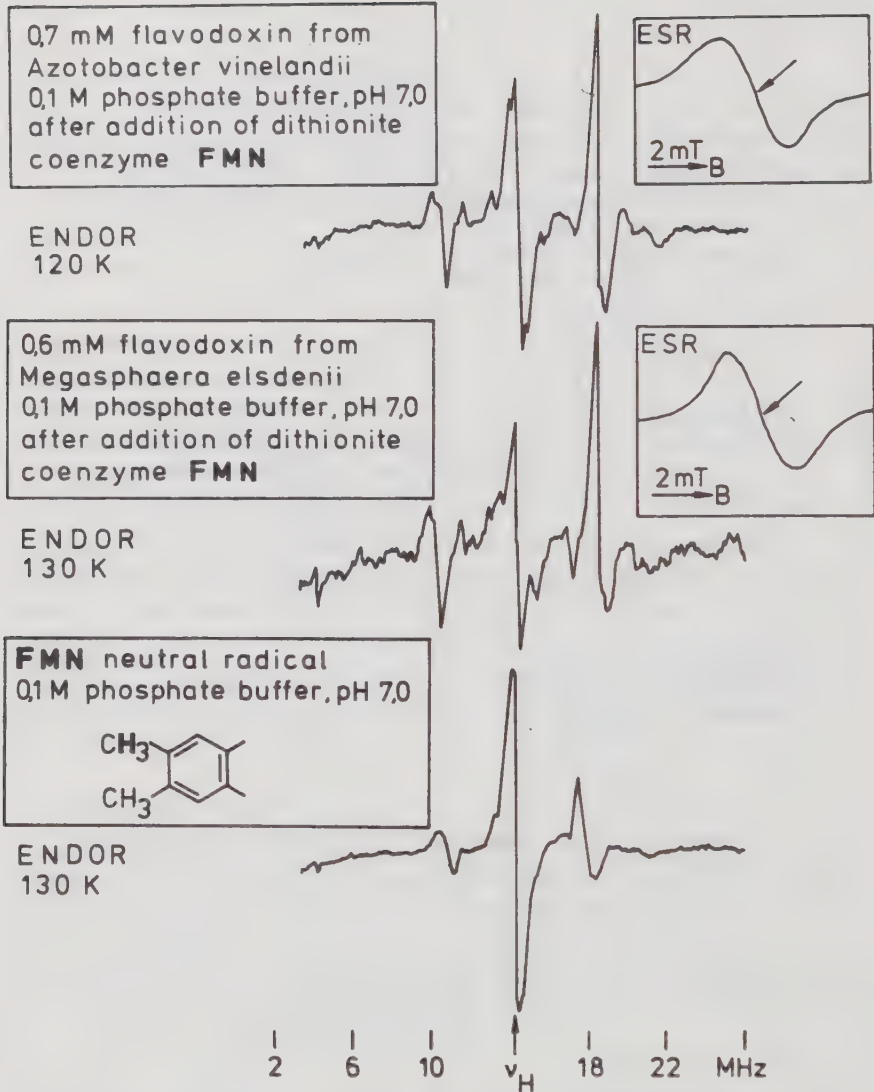
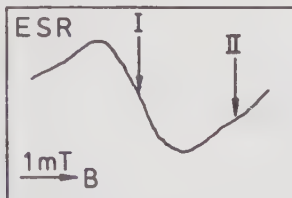
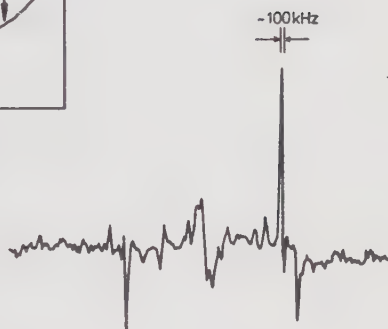


Abbildung 64. EPR- und ENDOR-Spektren der Radikale der Flavodoxine von *Azotobacter vinelandii* und *Megasphaera elsdenii* sowie zum Vergleich das ENDOR-Spektrum des FMN-Neutralradikals

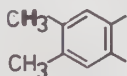
methanol oxidase from
Candida boidinii
 30 mM phosphate buffer, pH 7,5
 0,35 mM coenzyme **FAD**



ENDOR
 130 K



FAD anion radical
 NaOH



ENDOR
 130 K

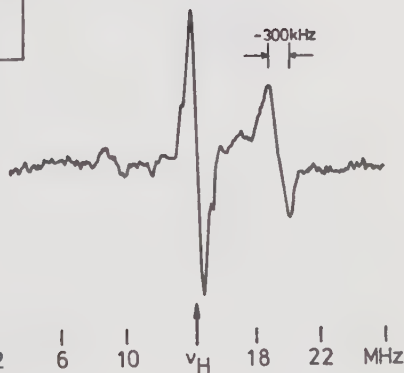
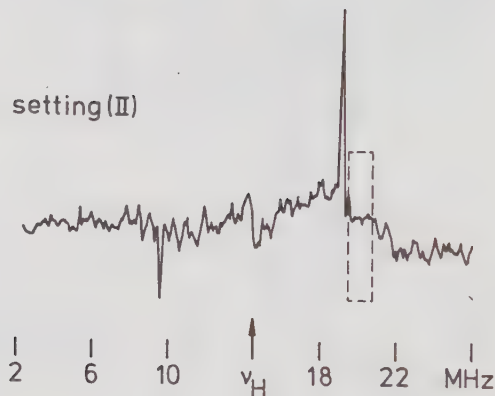


Abbildung 65. EPR- und ENDOR-Spektrum des Radikals der Methanol-Oxidase sowie zum Vergleich das ENDOR-Spektrum des FAD-Anionradikals

ENDOR
130 K
off-center field setting (II)



after addition of
pseudosubstrate
 NH_2OH

ENDOR
130 K



Abbildung 66. ENDOR-Spektrum des Radikals der Methanol-Oxidase bei EPR-Positionierung bei 2 (oben) sowie nach Zugabe des Pseudosubstrates NH_2OH (unten)

Tabelle 23. Kopplungskonstanten der Enzym-Radikale in gefrorenen Lösungen, 130 K, [MHz] = 0,1 MHz

Enzym	Coenzym	$a_{CH_3 I}^H (8)$	$a_{CH_3 II}^H (8)$	$a_{CH_3}^H (8)_{iso}$	$a_{CH_3}^H (7)$	pH-Wert	Farbe
NADPH-Dehydrogenase	FMN	12,3	10,3	10,9	1,8	9,0	rot
Flavodoxin Azotob.	FMN	9,5	7,7	8,3		7,0	blau
Flavodoxin Megasphe.	FMN	9,5	8,0	8,0	1,6	7,0	blau
Methanol-Oxidase	FAD	11,9	9,9	10,6		7,5	rot
Methanol-Oxidase ^B	FAD I	11,7	10,0	10,6		7,5	rot
	FAD II	12,4	10,5	11,2		7,5	rot

A Isotrope HFSCs errechnet nach $a_{iso} = 1/3 (A_I + 2A_{II})$

B Nach Zugabe von Hydroxylamin

schmale Methylsignale mit Linienbreiten von etwa 100 KHz, die deutlich in zwei Linien aufgespalten sind, und weitere kleinere Kopplungen (s. Abb. 65). Ein ENDOR-Experiment bei Sättigung der Flanke des EPR-Spektrums ergibt nur noch eine Komponente der Methylkopplung.

Gibt man Hydroxylamin als Hilfssubstrat zu der Enzymlösung, so erhöht sich die Radikalkonzentration merklich. Das ENDOR-Spektrum zeigt nun ein weiteres aufgespaltenes Linienpaar für die Methylprotonen. Die Intensitäten aller Signale sind gegenüber dem ersten Experiment größer (Abb. 66).

Das ENDOR-Spektrum des FAD-Anionradikals, dem Coenzym dieses Enzyms, zeigt eine größere Linienbreite der Signale und größere Intensität des Matrixsignals. Radikale vom freien FAD konnten durch Zusatz von Hydroxylamin nicht erzeugt werden.

4. Diskussion der Meßergebnisse

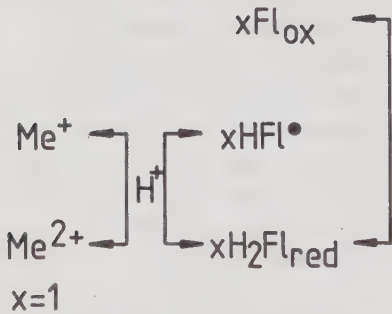
4.1. Radikale im Flavin-System

Wie schon in der Einleitung beschrieben wurde, sind Flavoproteine in vielen biochemischen Redoxreaktionen als Elektronenüberträger eingeschaltet. Ihre Coenzyme enthalten das Isoalloxazin-System, das ein oder zwei Elektronen von einem Donator aufnehmen und an einen Akzeptor weitergeben kann. Aufgrund der Vielzahl der möglichen Reaktionen unterteilt man diese Sorte von Enzymen in Unterklassen /15/. So unterscheidet man nach dem Reaktionsverhalten gegenüber Sauerstoff die Unterklassen der Dehydrogenasen, Oxidasen und Oxygenasen (Tab. 24, Abb. 67). Alle nehmen zwei Elektronen auf. Nur (Trans-) Dehydrogenasen und Oxidasen geben zwei Elektronen wieder ab, während Oxygenasen durch mehrfache Reaktion vier Redoxäquivalente weitergeben. Einige Dehydrogenasen, auch als Elektronen-Transferasen bezeichnet, transferieren nur ein Elektron unter Bildung eines katalytisch wirksamen Radikals. Von Enzymen, die ausschließlich zwei Elektronen übertragen können, kennt man sonst nur Radikale, die nicht physiologisch aktiv sind. Weiterhin sind Enzyme bekannt, die nur ein Elektron von einem Donator auf einen Akzeptor übertragen. Aufgrund des reinen Ein-Elektron-Schrittes nennt man sie "reine e-Transferasen". Selbstverständlich sind von ihnen katalytisch wirksame Radikale nachgewiesen worden.

Von sehr vielen Flavoenzymen lassen sich mehr oder weniger stabile paramagnetische Zwischenstufen darstellen, die nicht immer an enzymatischen Redoxprozessen beteiligt sind. In natura treten Radikale der Flavoenzyme auf, wenn nur ein Elektron auf einen entsprechenden Akzeptor übertragen wird. Alle anderen radikalischen Stufen von Flavoenzymen sind artifiziell und zeigen keinerlei biologische Aktivitäten. Künstliche und natürlich vorkommende Radikalspezies unterscheiden sich im allgemeinen schon in ihren Absorptionen des sichtbaren Lichtes /134,135/. So erscheinen künstlich erzeugte in einer roten Farbe, während enzymatisch aktive als blaue Radikale bezeichnet

Tabelle 24. Unterklassen der Flavoproteine

Redox-Äquiv.		Unterklasse	Radikal		Produkt d. O ₂ -Redukt.
Inp.	Outp.		Farbe	kat. wirks.	
2	2	Oxidase	rot	nein	HOO ⁻
2	2	Oxygenase	rot	nein	H ₂ O ₂
2	4	Oxygenase	rot	nein	O + H ₂ O
2	2	Transhydrogenase	-	-	O ₂ ⁻
2	1	Dehydrogenase (e-Transferase)	blau	ja	O ₂ ⁻
1	1	reine e-Transferase	blau	ja	O ₂ ⁻

e-Trans
ferase

Oxidase

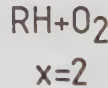
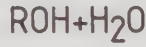
Oxi
genaseDehydro
genase

Abbildung 67. Elektronentransfer-Möglichkeiten der Flavoproteine

werden können. Wie später noch ausführlicher diskutiert werden soll, sind die verschiedenen Farben Folge der unterschiedlichen Bindung zum umgebenden Protein.

Bevor hier auf die ENDOR-Untersuchungen eingegangen wird, soll an dieser Stelle kurz eine Charakteristik der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Flavoenzyme gegeben werden. Flavodoxine /136-144/ kommen als reine Elektronen-Transferasen in verschiedenen Mikroorganismen vor und besitzen Molekulargewichte von 15 000 (bakterielle Flavodoxine) bis zu 22 000 (pflanzliche Flavodoxine). Sie enthalten als prosthetische Gruppe FMN und können mit anderen Enzymen größere Multienzymkomplexe bilden. Das Bodenbakterium *Azotobacter vinelandii* ist ein stickstoff-fixierendes und aerob arbeitendes Bakterium, dessen Flavodoxin ein Molekulargewicht von 23 000 hat. Das Bakterium *Megasphaera elsdenii* (früher *Peptostreptococcus elsdenii*) stammt aus der Flora des Wiederkäuer-Verdauungstraktes und arbeitet vorwiegend anaerob. Das Flavodoxin besitzt ein Molekulargewicht von 15 000.

Methanol-Oxidase (Alkohol-Sauerstoff-Oxidoreduktase, EC 1.1.3.13) stammt aus Hefezellen /145-147/ und katalysiert die Oxidation verschiedener Substrate mit Sauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid, z. B.



Das Molekulargewicht beträgt 600 000. Methanol-Oxidase besteht aus 8 Untereinheiten und enthält FAD als Coenzym. Diese Art von Enzymen arbeitet nicht sehr substratspezifisch, so daß auch andere Substanzen oxidiert werden können.

NADPH-Dehydrogenase (Old Yellow Enzyme, NADPH-(Akzeptor)-Oxidoreduktase, EC 1.6.99.1) wird aus Bierhefe gewonnen und hat ein Molekulargewicht von 100 000. Sie besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit FMN als Cofaktor /148-151/.

Um die Redoxpotentiale der Isoalloxazine zu beeinflussen, wurden von O'Brien bzw. Fenner und Goldmann Veränderungen des Grundgerüsts, das für die Redoxaktivität verantwortlich ist, vorgenommen. Der Ersatz des Stickstoffkernes in Position 5

durch ein Schwefelatom führte zum 5-Deaza-5-thiaflavin /57-59, 107,113,152/. Ebenso konnte das 5-Deazaflavin dargestellt werden, das in Position 5 nun ein Kohlenstoffatom trägt /60-63,153,154/. Wie in Abbildung 68 dargestellt, wird beim 5-Thiaflavin der reversible Zweielektronen-Transfer unterbunden /58/. Vielmehr läuft die Weiteroxidation des Radikals zu einer positiv geladenen Stufe, die ziemlich instabil ist und mit dem Semichinon komproportionieren oder irreversibel mit Wasser zu einem isolierbaren Sulfoxid weiterreagieren kann. 5-Deazaflavin dagegen ist nicht in der Lage, ein stabiles Radikal zu bilden, sondern reagiert in einem Zweielektronen-Schritt sofort zur Dihydrostufe. Es ist somit eher ein Modell für das Nikotinamid-System. Eine paramagnetische Spezies konnte nur im Rahmen von Radio-Pulse-Experimenten kurzzeitig dargestellt werden /122/. Diese Methode eignet sich auch zum Nachweis kurzlebiger Radikale. Es ist bereits gelungen, ein 5-Thia-FMN in Apo-Flavodoxine einzubauen. Das katalytische Reaktionsverhalten des Enzyms wurde dadurch drastisch geändert /58/. Die Eigenschaft der 5-Deazaflavine, nur zwei Elektronen zu übertragen, wird sogar von einigen Bakterien ausgenutzt. Man konnte kürzlich diese Flavinanalogen aus entsprechenden Mikroorganismen isolieren /155/ und charakterisieren.

Bekannt sind außerdem Flavine, bei denen der Stickstoffkern in Position 1 oder 3 durch Kohlenstoff ersetzt wurde. 1- und auch 3-Deazaflavin reagieren jedoch ähnlich wie Flavine und können entsprechende stabile Radikale bilden /60,156/.

Je nach Lösungsmittel erhält man aus den entsprechenden diamagnetischen Vorverbindungen die Anion-, Neutral- oder die Kationradikale (für Flavine s. Abb. 69). Durch Oxidation der Thiaflavine (aus der Synthese entsteht die reduzierte Stufe) bekommt man die Kationradikale und Neutralradikale, während Anionradikale nicht bekannt sind. Durch Reduktion der Flavine (die oxidierte Stufe ist als einzige an der Luft stabil) sind die drei verschiedenen protonierten paramagnetischen Stufen zugänglich. Das Kation entsteht in einer Säure, das Neutralradikal nach Blockierung der Position 5 in chlorierten Kohlenwasserstoffen und das Anion in einem basischen Lösungsmittel.

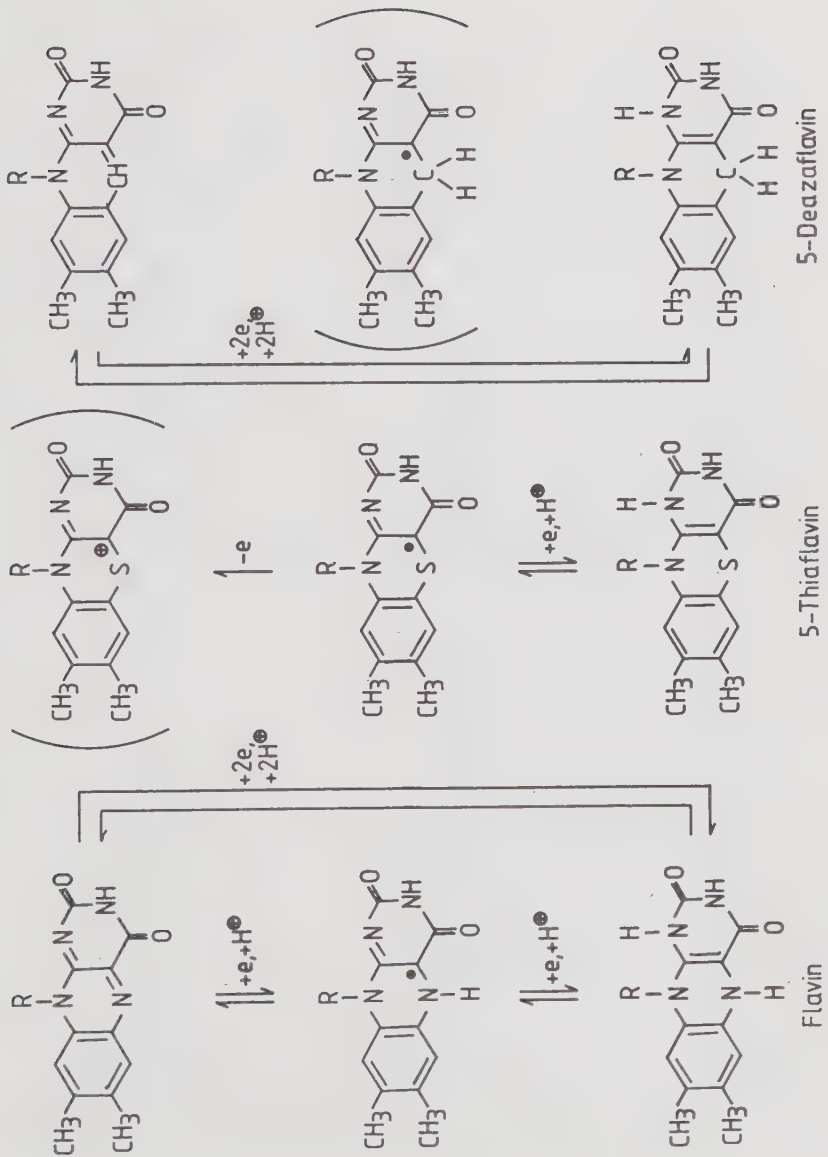


Abbildung 68. Redoxstufen der Flavine, 5-Thiaflavine und der 5-Deazaflavine, instabile Spezies in Klammern

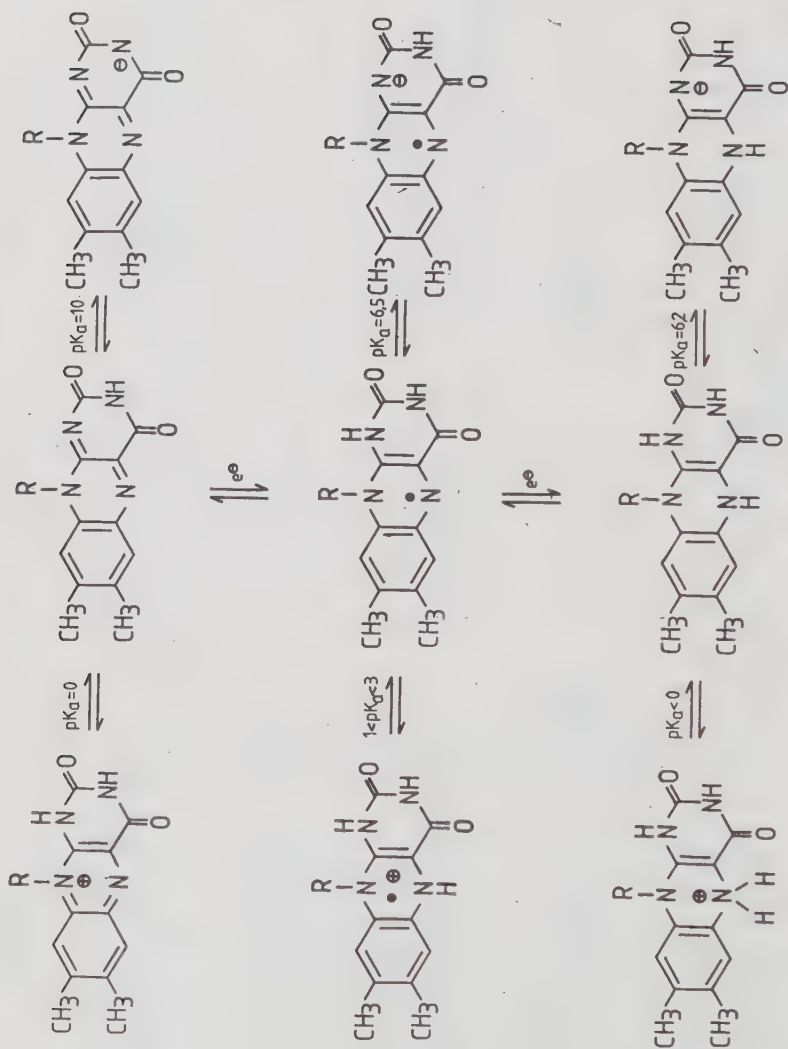


Abbildung 69. Redox- und Protonierungsgleichgewichte der Flavine

Die verschiedenen Radikale unterscheiden sich daher hauptsächlich durch ihre Protonierungsform und ihre Ladung und nicht durch den elektronischen Zustand, denn das ungepaarte Elektron befindet sich in allen Fällen im gleichen Orbital. Man sollte daher ähnliche Kopplungskonstanten für die drei Radikale erwarten. Die ENDOR-Experimente zeigen allerdings, daß die freie Ladung im Molekül starke Änderungen der Spindichteverteilung im Radikal bewirken kann. Somit bestehen zwischen den drei Flavinradikal-Typen größere Unterschiede. Hierauf wird noch ausführlicher eingegangen.

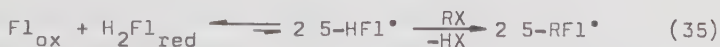
Zur ENDOR-Spektroskopie müssen die Radikale stabil sein, dürfen also keine Folgereaktionen eingehen. So läßt sich die Disproportionierung des Flavinradikals durch einige Änderungen des Moleküls, die die Struktur mehr oder weniger beeinflussen können, zugunsten einer hohen Radikalkonzentration unterdrücken. Hemmerich beschrieb verschiedene Möglichkeiten der Stabilisierung von Flavinradikalen /15/, von denen die folgenden in der vorliegenden Arbeit mit Erfolg angewendet wurden:

a) Protonierung



Die besten Meßbedingungen für ENDOR in flüssigen Lösungen ergaben sich für Lösungsmittelgemische aus einem organischen Lösungsmittel und einer starken Säure.

b) Alkylierung in Position 5



Das Neutralradikal der Flavine ist nur stabil, wenn eine Blockierung der Position 5 stattgefunden hat /31, 157/. Dazu wird die reduzierte Stufe in Position 5 methyliert. Anschließende Reoxidation des 5-Methyl-Dihydroflavins führt zum stabilen 5-Methyl-Flavin-Neutralradikal.

c) Deprotonierung



Die Radikalkonzentration in basischen Lösungsmitteln ist größer als in neutralen Lösungsmitteln /32/.

Aus der Literatur sind die größten Kopplungskonstanten der Flavin- und Thiaflavinradikale aus EPR-Messungen bzw. aus ENDOR-Messungen an gefrorenen Lösungen (beim Anionradikal des Lumiflavins auch in flüssiger Lösung) bekannt (s. Kapitel 3). In der Vergangenheit wurden die besten Ergebnisse erzielt, wenn die Simulationen der EPR-Spektren durch Variation der gemessenen Kopplungskonstanten und ihrer Multiplizität optimiert wurden. Bei den Thiaflavinen wurde analog den Flavinen vorgegangen.

Im folgenden sollen die Ergebnisse der ENDOR-Messungen der vorliegenden Arbeit in flüssigen Lösungen besprochen werden. Im Vordergrund stehen die Kationradikale, da die meisten Substanzen in ihren protonierten radikalischen Stufen gemessen werden konnten. Anhand der vorliegenden großen Zahl von HFS-Daten der unterschiedlichsten Kationradikale können verschiedene Eigenschaften der Moleküle eingehender diskutiert und mit Aussagen der Literatur, soweit in Kapitel 3 nicht geschehen, verglichen werden.

4.2. Ergebnisse der Messungen an flüssigen Lösungen

4.2.1. Radikale der Grundkörper

Vom Phenazin ist ein Kationradikal bekannt, vom Phenothiazin sowohl ein Kation- als auch ein Neutralradikal. Diese paramagnetischen Spezies sowie die Kationradikale einiger N-Alkyl-substituierter Derivate sollen als Modellverbindungen für die Flavin- und Thiaflavin-Radikale dienen. Phenazin kann als Modell eines Flavins angesehen werden, während Phenothiazin ein Schwefelatom im π -System besitzt und somit als Modell eines Thiaflavins dienen kann. Erfreulicherweise lassen sich ihre Kationradikale auf die gleiche Weise erzeugen wie die

der Isoalloxazine und der Thiaisoalloxazine. Ein Kationradikal des Acridins (Modell für Deazaflavin) läßt sich nach den hier verwendeten Methoden nicht darstellen, was aber in Übereinstimmung mit dem Redoxverhalten des entsprechenden Flavins steht /115/. Bisher ist nur ein Acridin-Anionradikal bekannt /115, 158-160/, das jedoch bei tieferen Temperaturen dimerisiert. In der Reihe der 5-Deazaflavine wird ebenfalls von einem diamagnetischen Dimeren berichtet, das der Oxidationsstufe eines Radikals entspricht /161/. Ein stabiles Radikal konnte aus diesem Dimeren nicht erzeugt werden.

Von den hier untersuchten Grundmolekülen sind bisher nur EPR-Spektren und die daraus gewonnenen Kopplungen bekannt /123-126, 129, 131, 132/. Einzig Kennedy et al gelang es, ein ENDOR-Spektrum des Phenothiazin-Neutralradikals aufzunehmen /127/. Die Zuordnung der HFSCs aus den ENDOR-Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden analog den EPR-Ergebnissen der Literatur vorgenommen. Einzig die Kopplungen der Methylprotonen in den substituierten Verbindungen konnten infolge der großen Intensitäten der Resonanzlinien erkannt werden.

Von Methylgruppen ist bekannt, daß sie selbst bei sehr tiefen Temperaturen noch um ihre Bindungsachse zum Grundgerüst rotieren können /76, 77/. So werden die HFS-Anisotropien dieser Protonen nahezu ausgemittelt. Wie bereits im theoretischen Teil dieser Arbeit erwähnt, geht die HFS-Anisotropie kritisch in die Relaxationsrate ω_n , aber auch in ω_x und in geringerem Maße in ω_e ein. Damit ist das ENDOR-Enhancement von der Größe der anisotropen Hyperfeinwechselwirkung der Kerne abhängig, da maximale ENDOR-Signale für $\omega_e = \omega_n$ erhalten werden können. Im Falle der Methylprotonen ist die HFS-Anisotropie durch die schnelle Rotation des Substituenten sehr klein, und bei Temperaturen von 260 K in Toluol/Trifluoressigsäure können sehr intensive ENDOR-Signale registriert werden. α -Protonen und Stickstoffkerne weisen größere Anisotropiewerte auf. Ihre ENDOR-Linien sind deshalb unter diesen Meßbedingungen intensitätsschwächer.

Die größten Spinpopulationen zeigen erwartungsgemäß die Stickstoffatome. Eine zusätzliche Methylgruppe in den Phenazi-

nium-Derivatenergibt ein weniger symmetrisches Radikal. Die elektronenschiebenden Eigenschaften dieser β -Protonen in Position 10 scheinen Spindichte von N-10 in Richtung N-5 zu verschieben, da bei $12^{\bullet+}$ die Stickstoffkopplung von Position 10 kleiner als die von Position 5 ist. Ebenfalls ändern sich die anderen Protonenkopplungen um bis zu 1 MHz. Phenothiazin-Kationradikale sind bereits durch die beiden verschiedenen Heteroatome unsymmetrischer und zeigen daher mehr Protonenkopplungen als Phenazin-Radikale. Darüber hinaus bewirkt das Schwefelatom eine drastische Umverteilung der Spindichten gegenüber den Aza-Analogen. Der größere Atomradius und die geringere Überlappung des π -Systems mit den großen Orbitalen des Schwefelkernes sind mögliche Gründe für diese Änderungen /162/. Man erhält nun die größte Kopplung für die Positionen 1 und 3, während Position 2 zusammen mit Position 4 die kleinsten Werte aufzeigt. Die eindeutige Zuordnung von Kopplungskonstanten zu Molekülpositionen durch den Vergleich der ENDOR-Spektren einiger spezifisch deuterierter Verbindungen und die Aufklärung der räumlichen Struktur vom Phenothiazin- und vom N-Methyl-Phenothiazin-Radikal sollten hier genauere Erklärungen bringen.

Vom Promazin-Kationradikal $13c^{\bullet+}$ und vom Alimemazin-Kationradikal $13d^{\bullet+}$ (10-(3-Dimethylamino-2-methylpropyl)-phenothiazin) sind EPR-Spektren aus der Literatur bereits bekannt /131,132/. Man diskutiert dort die Inäquivalenz der beiden β -Protonen des Substituenten in Position 10. Das ENDOR-Spektrum des Promazin-Kationradikals deutet nicht auf Verhältnisse hin, wie von Ruperez et al /132/ für das Alimemazin-Radikal beschrieben. Während in seinen Untersuchungen zwei β -Protonen-Kopplungen von 15 MHz und 5,6 MHz für $12d^{\bullet+}$ durch die Simulation des EPR-Spektrums gefunden wurden, kann hier im ENDOR-Spektrum von $13c^{\bullet+}$ nur eine Kopplung von +10 MHz und eine γ -Kopplung von +0,4 MHz registriert werden. Aus der Hyperkonjugationstheorie läßt sich nach McConnell der Winkel zwischen der CH_3 -Bindung und dem p_z -Orbital des benachbarten N-Atoms aus der β -Protonenkopplung bestimmen. Man legt die McConnell-Beziehung /91,92/

zugrunde

$$a_{\text{N-CH}_2}^{\text{H}} = \varphi_{\text{N}} B \cos^2 \vartheta \quad (37)$$

und setzt für das Produkt aus der Spindichte am Stickstoffatom und dem B-Parameter die doppelte Methylkopplung unter Annahme freier Rotation der Methylgruppe im Methyl-Phenothiazin-Kationradikal ein:

$$\varphi_{\text{N}} B = 2 a_{\text{N-CH}_3}^{\text{H}} \quad (38)$$

Nun lassen sich die Verdrillungswinkel aus dem Verhältnis der entsprechenden β -Protonenkopplung zur Methylprotonenkopplung bestimmen:

$$\cos^2 \vartheta = a_{\text{N-CH}_2}^{\text{H}} / (2 a_{\text{N-CH}_3}^{\text{H}}) \quad (39)$$

Die Kopplungen des Promazin-Kationradikals ergeben einen Winkel von 60° . Dies bedeutet, daß beide β -Protonen äquivalent sind und der große dritte Substituent an diesem Kohlenstoffatom senkrecht zum Phenothiazin-Gerüst steht (s. Abb. 70). Es handelt sich sicherlich um die energetisch günstigste Konfor-

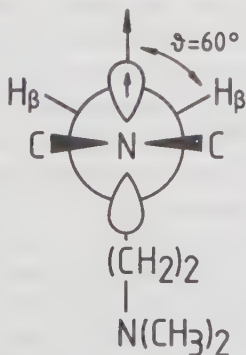


Abbildung 70. Newman-Projektion der Konformation in Position 5 des Promazin-Kationradikals

mation. Die Kopplungen von Ruperez et al für $12d^{*+}$ ergeben allerdings die Winkel von 52° und 68° . Es ist schwer einzusehen, daß eine Methylgruppe in 2'-Position bei $12d^{*+}$ eine derartige Verdrehung des Restes in Position 10 bewirken soll. Durch entsprechende ENDOR-Untersuchungen an diesem System sollen diese Aussagen von Ruperez überprüft werden /163/.

Der Protonierungszustand des Phenothiazin-Radikals zeigt großen Einfluß auf die Spindichte-Verteilung. Für die Änderung und Umverteilung der Kopplungskonstanten nach Protonierung des Neutralradikals sollte die Ladung des Radikals sowie das Proton in Position 10 verantwortlich sein.

4.2.2. Alloxazin- und Isoalloxazin-Radikale

Kationradikale

Aus der Literatur sind viele EPR-Arbeiten /30-40/ und auch einige ENDOR-Experimente /41-49/ von den verschiedenen protonierten Isoalloxazin- und Alloxazin-Radikalen bekannt. Die meisten ENDOR-Experimente wurden an den gefrorenen Lösungen der Flavin-Radikale vorgenommen. Es sind nur wenige ENDOR-in-Lösung-Spektren bekannt, aus denen aber nur die hochfrequenten Signale zweier Methylkopplungen entnommen werden konnten /44/. Die meisten bekannten Kopplungskonstanten stammen aus EPR-Spektren, die mit Hilfe von Computern ausgewertet wurden. Die Markierung einiger Positionen im Radikal erlaubte die Zuordnung der HFS-Daten zu Molekülpositionen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals eine Vielzahl von Alloxazin- und Isoalloxazin-Radikalen durch ENDOR-in-Lösung untersucht. Es wurden sämtliche Protonenkopplungen größer als 0,5 MHz und Stickstoffkopplungen größer als 1 MHz inklusive ihrer relativen Vorzeichen bestimmt. Die Zuordnung konnte sowohl bei den Anion- und Neutralradikalen als auch bei den Kationradikalen mit verschiedenen Methoden überprüft werden. Neben den Modellverbindungen wurden außerdem die ENDOR-Spektren der flüssigen Lösungen von Coenzymradikalen (Riboflavin, FMN und FAD) registriert.

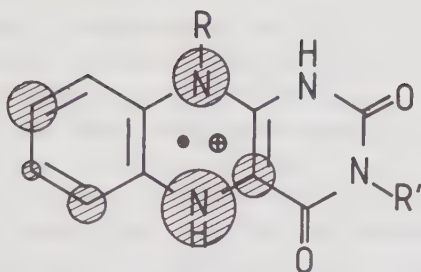


Abbildung 71. Spindichte-Verteilung im Flavin-Kationradikale;
der Radius der Kreise gibt qualitativ die Größe
der Spindichte wieder

Die Linienintensitäten lassen, wie schon oben beschrieben, Rückschlüsse auf die Relaxation und damit die Art der Kerne zu. So erscheinen z. B. Stickstofflinien erst bei hohen Temperaturen. Beobachtet man die Intensitäten der ENDOR-Protonenlinien zwischen 210 K und 300 K, so kann man drei Kopplungen den frei rotierenden Methylprotonensorten der Positionen 7, 8 und 10 zuordnen, während das α -Proton in Position 6 schwerer nachzuweisen ist. Ebenso wie für NH-Protonen kann man ausreichend intensive Linien für diese Kopplung erst bei höheren Temperaturen erhalten. Die Messung einiger deuterierter Radikale in deuterierten Lösungsmitteln erlaubt die weitere Zuordnung von Protonenkopplungen. Somit ergeben sich Spindichten an den Molekülpositionen wie in Abbildung 71 dargestellt. Überraschenderweise kann keine HFSC für das Proton in Position 9 gemessen werden, während eine Kopplung von 1 MHz den Protonen in Position 3 zugeordnet werden muß. Dies steht im Widerspruch zu der Zuordnung von Müller et al /26/, die dort allerdings analog den Ergebnissen vom Anionradikal durchgeführt wurde. Eine dritte Möglichkeit der Ermittlung der HFSCs von bestimmten Protonen ist der Vergleich der relativen Vorzeichen. Aufgrund der π - σ -Spinpolarisationstheorie sollten α -Protonenkopplungen im allgemeinen negative Vorzeichen aufweisen, während die

Hyperkonjugationstheorie positive Vorzeichen für β -Protonen-HFSCs voraussagt. Wird nun im Flavin-Radikal eine Methylgruppe durch ein Proton ersetzt, sollte sich zumindest bei großen HFS-Werten das Vorzeichen umkehren. Dies dient der Zuordnung von Kopplungen zu Positionen, die schwer zu markieren sind.

Die für Position 4a durch EPR-Untersuchungen gefundene ^{13}C -Kopplungskonstante ist der in der Literatur beschriebenen gleich /133/. Walker et al verglichen dazu die EPR-Spektren von ^{13}C -markierten Flavin-Radikalen mit verschiedenen Markierungsgraden. Auch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ergeben einen relativ kleinen Wert. Dies verwundert, ist doch die größte Spindichte am benachbarten Stickstoffatom zu finden. Allerdings bestimmt nach der Karplus-Fraenkel-Beziehung nicht nur die Spindichte am ^{13}C -Atom die ^{13}C -Kopplungskonstante, sondern es müssen die Spindichten an den Nachbaratomen berücksichtigt werden, die durch π - σ -Wechselwirkung zur HFSC des Kohlenstoffatoms beitragen /165/. Die jeweiligen Beiträge der Spindichten bzw. ihre Vorzeichen hängen ab von der Hybridisierung der Bindungselektronen und von der Struktur des Radikals. Somit kann nicht direkt von der Kopplungskonstanten auf die Spindichte am Kohlenstoffatom geschlossen werden. Baudet et al konnten außerdem bereits durch theoretische Rechnungen zeigen, daß die Spindichte an C-4a im Kationradikal relativ klein gegenüber der im Anionradikal sein muß /164/.

Der Vergleich mit weiteren bekannten Rechnungen nach den verschiedensten Methoden (HMO, INDO, ab initio) /166-170/ erscheint nicht sinnvoll, da bisher die meisten theoretischen Ergebnisse Spindichten voraussagen, die die Größenordnungen und Vorzeichen der Kopplungen aus den EPR- und ENDOR-Untersuchungen nicht wiedergeben.

Die Elektronenstrukturen der Kationradikale von Alloxazinen und Isoalloxazinen sollten gleich sein, da die Stickstoffatome im aziden Medium alle dreifach koordiniert sind. Interessanterweise sind jedoch sämtliche HFSCs der Isoalloxazin-Kationradikale von denen der Alloxazin-Kationradikale verschieden. Eine Methylgruppe in Position 10 bewirkt eine teilweise

drastische Änderung der Kopplungskonstanten. So nehmen die HFSCs der Protonen in den Positionen 5, 7 und 3 ab, während die der Positionen 6, 8 und 10 zunehmen (s. Abb. 72). Die größten Änderungen können für die Kopplungen der Positionen 8 und 10 mit bis zu 2 MHz registriert werden. Für N-10, das durch die Einführung dieses Substituenten direkt beeinflusst wird, kann diese Änderung verstanden werden, da eine Methylgruppe elektronenschiebende Eigenschaften zeigt. Da auch andere HFSCs stark verändert sind, kann von ähnlichen Strukturen der Alloxazin- und Isoalloxazin-Radikale nur unter Einschränkung gesprochen werden. Position 8 scheint aufgrund ihrer hohen Spindichte besonders stark auf solche Veränderungen im Molekül zu reagieren. Man könnte sogar von einer Meßsonde sprechen, denn diese Eigenschaft läßt sich bei der Untersuchung größerer Molekülverbände ausnutzen.

6	7	8	10	5	
↓	↑	↑	↑	↓	7
↓	↑	↑	↓	↑	8
↑	↑	↑	↑	↓	10

Abbildung 72. Veränderungen der Kopplungen bei Methylsubstitution eines α -Protons bei den Flavin-Kationradikalen, waagerechte Reihe - eingeführte Methylgruppe, senkrechte Reihe - beobachtete Kopplung

Die Substitution eines α -Protons durch eine Methylgruppe ändert gemäß den McConnell-Beziehungen den Betrag der Kopplungskonstanten nur wenig, häufig wird eine geringe Zunahme der Werte gefunden, wie im Falle der α - und β -Protonen in Position 10. Wird allerdings im benzoiden Teil des Moleküls eine Substitution eines Protons vorgenommen, so erkennt man Änderungen

der Kopplungen in verschiedene Richtungen. So ist z. B. die β -Protonenkopplung der Positionen 7 und 8 um 50% bzw. 20% größer als die entsprechende α -Protonen-HFSC, während für die Position 6 nach Substitution des Protons durch eine Methylgruppe sogar eine Reduktion der HFSC um bis zu 50% festgestellt werden kann. Wie aus Abbildung 72 ebenfalls hervorgeht, ändern sich die Kopplungen der Positionen auch charakteristisch, wenn eine Methylgruppe an anderer Stelle in das Grundgerüst neu eingeführt wird. Diese Tendenzen sind für Alloxazin- und auch für Isoalloxazin-Kationradikale gleich.

In einem Fall konnte auch der Einfluß eines elektronenziehenden Substituenten, nämlich Brom, auf die Kopplungen getestet werden. Da dieser Substituent allerdings in die Position 7 mit geringer Spindichte eingeführt ist, ergeben sich keine größeren Änderungen. Nur die Protonenkopplung der Position 8 wird um immerhin 0,7 MHz gegenüber der halogenfreien Verbindung verringert.

Natürlich vorkommende Isoalloxazin-Derivate tragen in Position 10 sperrige Hydroxyalkylketten wie Ribityl, Ribitylphosphat oder andere. Verbindungen mit großen Substituenten in dieser Position können einige Eigenschaften dieser Coenzyme gut simulieren. In dieser Arbeit wurden dazu 10-Hydroxyethyl- und 10-Benzyl-Lumiflavin-Kationradikale mit der ENDOR-Spektroskopie untersucht. Weiterhin konnten die ENDOR-Spektren von zwei Radikalen registriert werden, bei denen die Beweglichkeit des Substituenten in Position 10 weitgehend unterbunden wurde durch eine weitere Bindung des Alkylrestes zu Position 1. Diese beiden Radikale 8a^{•+} und 8b^{•+} unterscheiden sich nur in der Größe des neu entstandenen Ringes.

Während sich die Kopplungen der anderen Positionen nicht wesentlich verändern, zeigen die β -Protonenkopplungen des Substituenten in Position 10 um bis zu 50% verringerte Werte. Hieraus lassen sich nach McConnell die Winkel zwischen der CH_3 -Bindungsachse und dem p_z -Orbital des α -Kohlenstoffatoms errechnen. Die Werte von etwa 57° bis 63° bedeuten, daß die beiden Methylenprotonen fast äquivalent sind. Vernachlässigt man Umlapppvorgänge und andere dynamische Prozesse (die Kopp-

lungskonstanten sind nicht temperaturabhängig), so kann hier von einer Vorzugskonformation gesprochen werden, bei der der große Substituent nahezu senkrecht zum Ringsystem angeordnet ist, wie dies für das Promazin-Kationradikal bereits gefunden werden konnte (s. o.). Es handelt sich um den thermodynamisch stabilsten Zustand, da so die geringste sterische Behinderung auftritt.

Die Radikale der Coenzyme Riboflavin, FMN und FAD zeigen dieselbe Reduktion der β -Protonenkopplungen von Substituenten in Position 10. Für Reste mit ungeschützten alkoholischen OH-Gruppen ergeben sich dafür Winkel von etwa 58° (s. Abb. 73a). Hier lassen sich sogar bei $\text{FMN}^{\bullet+}$ und $\text{FAD}^{\bullet+}$ Aufspaltungen dieser Linien erkennen, die eine meßbare aber geringe Inäquivalenz der beiden Methylenprotonen aufzeigen. Anscheinend kann der Ribityl-Rest allein noch gut um seine N-C-Bindungsachse rotieren, so daß dieser Effekt bei Temperaturen über 260 K nur in Form einer verbreiterten Linie zu erkennen ist.

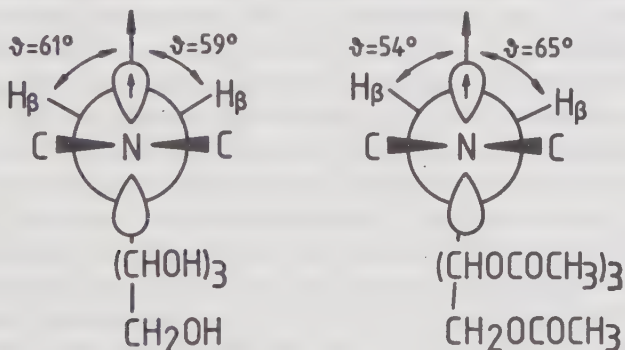


Abbildung 73. Newman-Projektion der Konformation in Position 10 des Riboflavin- und des Tetraacetyl-Riboflavin-Kationradikals (a) bzw. (b)

Interessant ist die entsprechende Kopplung des Tetraacetyl-Riboflavin-Kationradikals. Aus der Kopplung von etwa 10 MHz errechnet sich ein Winkel von 53° . Außerdem tritt eine zweite Kopplung von etwa 5 MHz auf, die dem zweiten β -Proton, für dessen CH_β -Bindungsachse ein Winkel von etwa 65° zum Grundgerüst

besteht, zugeordnet werden kann (s. Abb. 73b). Selbst bei einem Meßfehler im ENDOR-Experiment von 100 KHz ergibt sich nur eine Differenz der Winkel von $\pm 0,5^\circ$. Somit sind diese unterschiedlichen Winkel durchaus signifikant, da für alle Kationradikale gleiche Meßbedingungen herrschen und auch dieselben Konstanten in den Gleichung 37 bis 39 von McConnell benutzt wurden. Bei $7q^{*+}$ sind die polaren Hydroxygruppen geschützt durch Acetylsubstituenten und können daher möglicherweise keine größeren Wechselwirkungen mit dem umgebenden polaren Lösungsmittel Trifluoressigsäure durchführen, so daß die Lösungsmittelhülle deutlich kleiner als beim Riboflavin ist. Somit könnte ein weiterer sterischer Einfluß, vielleicht der der Methylgruppe in Position 8 (s. auch Diskussion des Tetraacetyl-Ribityl-Thiaflavin-Kationradikals), für die Einstellung einer leicht veränderten Konformation, die energetisch günstiger ist, verantwortlich sein.

In einem anderen Fall zeichnen sich ähnliche sterische Verhältnisse ab. Das 8 α -Morpholino-Tetraacetyl-Riboflavin enthält zusätzlich in Position 8 einen großen Substituenten. Dieser simuliert ein kovalent gebundenes Protein. Diese Verbindung kann als Modell für die Succinat-Dehydrogenase angesehen werden, bei der die prosthetische Gruppe über die Position 8 des Isoalloxazin-Gerüsts kovalent an das Apoprotein gebunden ist. Die Rotation des Substituenten in Position 8 ist nun stark behindert, so daß die sehr intensive Resonanzlinie für die Methylgruppe im ENDOR-Spektrum nicht mehr registriert werden kann. Stattdessen treten intensitätsschwächere Linien für kleinere Kopplungen auf. Aus den breiten Signalen lassen sich Kopplungen errechnen, die für beide Substituenten in den Positionen 8 und 10 Verdrehungswinkel von etwa 50° bis 60° der CH_3 -Bindungsachse gegenüber dem π -System ergeben. Infolge des schlechten Signal-Rausch-Verhältnisses können allerdings keine genaueren Werte angegeben werden.

Neutralradikale

Durch einen unpolaren Substituenten in Position 3 des Lumiflavins oder durch Acetylierung der Hydroxygruppen des Riboflavins werden diese beiden Verbindungen gut löslich in neutralen organischen Lösungsmitteln. So lassen sich die Neutralradikale dieser Verbindungen in chlorierten Kohlenwasserstoffen durch eine Zweiphasen-Reduktion erzeugen. Allerdings muß die Position 5 des Isoalloxazin-Gerüsts durch einen Alkylrest gegen Folgereaktionen (Disproportionierung, Oxidation) blockiert sein, damit über mehrere Stunden stabile Radikale dargestellt werden können.

Der Vergleich der Kopplungskonstanten aus dem ENDOR-Experiment mit denen der Kationradikale zeigt, daß sämtliche Werte bis auf einen reduziert sind gegenüber denen der entsprechenden protonierten Spezies. Dies ist aus der Literatur bereits bekannt /31/. Wie auch an anderen Verbindungen bereits gefunden, bewirkt eine positive Ladung des Radikals eine Vergrößerung besonders der β -Protonen-Kopplungen /171/. Dies kann als Hinweis auf eine Einbeziehung von β -Protonen in das mesomere π -Elektronensystem gewertet werden, wie es die Hyperkonjugationstheorie voraussagt. Eine positive Ladung im Flavinradikal begünstigt eine mesomere Grenzstruktur, bei der die β -Protonen in das π -System integriert sind. Muller und Mulliken /172/ sprechen von "isovalent hyperconjugation" für den Hyperkonjugationseffekt bei Kationen, da in den mesomeren Grenzstrukturen des π -Systems inklusive den β -Protonen keine Ladungstrennung auftritt bzw. die positive Ladung erhalten bleibt und die Anzahl der kovalenten Bindungen in allen Resonanzstrukturen gleich ist. Dies steht im Gegensatz zur "sacrificial hyperconjugation". Mit diesem Begriff wird die hyperkonjugative Einbeziehung der β -Protonen in ein aromatisches System ohne positive Ladung beschrieben. Hier muß eine Ladungstrennung angenommen werden, um Spindichte am β -Proton erklären zu können. Dieser Vorgang erfordert Energie, und somit ist die Resonanz des π -Systems und der β -Protonen herabgesetzt. Damit kann eine geringere Spindichte an den β -Protonen von Neutralradikalen gegenüber den Kation-

radikalen erklärt werden.

Die Stickstoffkopplung von Position 5 ist als einzige im Neutralradikal größer als im Kationradikal. Dies läßt sich vielleicht durch die sehr starke elektronische und konformative Änderung an dieser Molekülposition durch Einführung einer Methylgruppe erklären. Es taucht die Frage auf, ob das Molekül in diesem Teil noch planar ist. Dies wurde bereits von Walker et al nach Auswertung der ^{13}C -Kopplungskonstanten für Position 4a angezweifelt /133/. Die Ergebnisse der Festkörper-Spektren, die auch Aussagen über räumliche Strukturen zulassen können, sollten hier weitere Auskünfte geben. Im übrigen sind wie bei den Kationradikalen die Kopplungen der Protonen in den Positionen 8 und 10 am stärksten geändert, die immerhin um 2,8 MHz bei der neutralen Stufe geringer sind. Eine Kopplung für Position 3 ist nicht mehr nachweisbar. Sie ist beim Lumiflavin-Radikal besonders durch die behinderte Rotation des Substituenten unmeßbar klein geworden.

Der Vergleich mit den wenigen bekannten Literaturdaten z. B. von Müller et al /31/ zeigt, daß auch hier die EPR-Spektroskopie in Verbindung mit der Analyse durch Computer gute Ergebnisse bringen kann. Sie kann nur in der Genauigkeit und der Zuordnung kleiner Kopplungen nicht mit der ENDOR-Spektroskopie konkurrieren. Außerdem fehlte bisher die Information über die Vorzeichen der HFSCs.

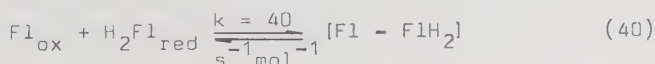
Das ENDOR-Spektrum des Tetraacetyl-Riboflavin-Neutralradikals zeigt außer der erwarteten Reduktion der HFS-Werte eine nicht sofort zuzuordnende Protonenkopplung von etwa 8,7 MHz mit intensitätsschwachen Linien. Man kann diese HFSC einem der beiden β -Protonen des Substituenten in Position 10 zuordnen und erhält eine Verdrehung der CH_3 -Bindungsachse gegenüber dem π -System von etwa 57° . Dies entspricht der sterischen Konformation, die von dem Kationradikal bereits bekannt ist. Die Kopplung des zweiten β -Protons sollte nach der Berechnung nach McConnell bei etwa 4 MHz liegen und kann durchaus durch andere intensive ENDOR-Signale überlagert sein.

Anionradikale

Von den Anionradikalen einiger Flavine sind ebenfalls mehrere EPR-Untersuchungen bekannt /32,37,173/. Weiterhin gelang es Eriksson et al /44/, ENDOR-Spektren von flüssigen Lösungen des Lumiflavin-Anionradikals zu registrieren. Allerdings berichten sie nur von Spektren des durch Metallkationen stabilisierten Radikals. Diese komplexbindungsartige Wechselwirkung des Isoalloxazin-Gerüsts mit einem Metallion könnte jedoch drastische Änderungen der Kopplungen bewirken. Zur Aufklärung der Spindichteverteilung in einem Flavin-Anionradikal wäre es besser, ENDOR-Experimente an der unkomplexierten paramagnetischen Stufe durchzuführen.

In den basischen organischen Lösungsmitteln DMF oder DMSO können Flavin-Anionradikale durch Reaktion mit einem tertiären Butylat erzeugt werden. Einerseits tritt jedoch nach relativ kurzer Zeit bei Überschuß des Reagenzes eine Dimerisierung ein, und andererseits eignen sich diese Lösungsmittel unter anderem wegen ihrer starken Mikrowellen-Dämpfung nicht für ENDOR-Untersuchungen. Erst die elektrochemische Reduktion der Flavine in dem "ENDOR-freundlichen" Lösungsmittel HMPA ermöglicht die Anwendung der Mehrfachresonanzmethoden auf Flavin-Anionradikale. Allerdings führt jede basische Verunreinigung der Lösung zu einem Radikal, ohne daß ein elektrochemischer Prozeß stattgefunden hat. Aufgrund der Farbe der Lösung kann man dieser paramagnetischen Spezies die dimere Struktur wie von Ehrenberg et al vorgeschlagen /32/ zuschreiben. Weiterhin entsteht ein Flavin-Anionradikal erst bei einer relativ hohen Reduktionsspannung (-2,7 V), und die Elektrolyse erfordert bis zum Erreichen einer optimalen Radikalkonzentration viel Zeit.

Die Kenntnisse über einige Reaktionen der Flavine könnten zur Erklärung dieser Phänomene dienen. So kennt man die Bildung eines Dimeren aus der oxidierten und völlig reduzierten Stufe /174-176/, von dem die Struktur allerdings nur unvollständig aufgeklärt ist:



Dieses diamagnetische Dimere kann nun in einer schnellen Reaktion zum Radikal spalten und im leicht basischen das Anionradikal bilden:



Weiterhin berichtet Ehrenberg /32/, daß bei Überschuß einer starken Base ein paramagnetisches Dimeres entsteht. Er nimmt an, daß ein Proton von der reaktiven Methylgruppe in Position 8 des Flavins abgespalten werden kann und aus zwei Flavinmolekülen ein dimeres Biradikal a entstehen kann (s. Abb. 74). Dieses kann ein weiteres Flavinmolekül reduzieren. Es entstehen das Flavin-Anionradikal und das dimeres Monoradikal b. Als Beweis für diese Strukturen der Dimeren gibt Ehrenberg ein synthetisiertes dimeres Flavin an.

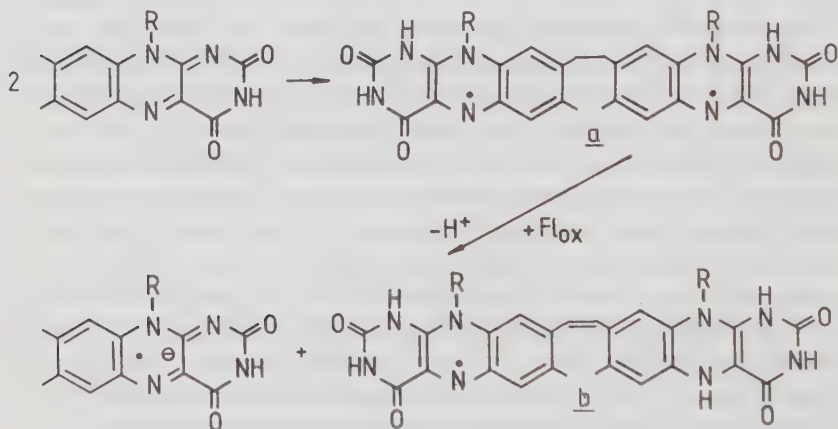


Abbildung 74. Bildung eines dimeren Radikals nach /32/

Möglicherweise wird im elektrochemischen Experiment zuerst über einen langsamen Zwei-Elektronenschritt das Dihydroflavin erzeugt, das nun nach Bildung des Dimeren mit dem Ausgangsstoff in basischem Milieu das Anionradikal freisetzt wie in den

Gleichungen 40 und 41 dargestellt ist. Die hohen benötigten Spannungen und die langen Elektrolysezeiten lassen sich durch die hier gezeigten Reaktionen mit ihren kinetischen Daten erklären.

Ein anderes Gleichgewicht könnte bei Anwesenheit einer starken Base im Überschuß eingestellt werden. Wie in Abbildung 74 wird ein instabiles dimeres Biradikal des Flavins gebildet, das sofort mit einem Molekül des Ausgangsmaterials ein dimeres Monoradikal und das Anionradikal ergibt. Ein Beweis dieser Reaktionsabfolge konnte noch nicht erbracht werden. So ist ein langlebiges Biradikal ebensowenig spektroskopiert wie die von Ehrenberg et al vorgeschlagene Struktur des dimeren Monoradikals sichergestellt worden.

Die negative Ladung im Flavin-Anionradikal bewirkt nun entgegen den Erwartungen eine starke Umverteilung der Spindichten. So wird z. B. die Kopplung der Position 10 (sowohl die Stickstoff-HFSC als auch die der β -Protonen) um 25% vermindert gegenüber dem Kationradikal. Die HFSCs der Position 8 ist um 15% und die des 6α -Protons sogar um 100% größer, wie der Vergleich einiger deuterierter Verbindungen zeigt. Außerdem existiert beim Anionradikal eine gut meßbare Spindichte am Kohlenstoffatom 9 (s. Abb. 75).

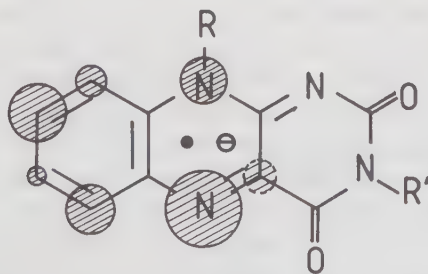


Abbildung 75. Spindichte-Verteilung im Flavin-Anionradikal

Die β -Protonenkopplung für den Substituenten in Position 10 ist beim Tetraacetyl-Riboflavin-Anionradikal auch kleiner als bei der entsprechenden Methylverbindung. Aus dem ENDOR-Experiment kann man zwei Kopplungen für die inäquivalenten Methylenprotonen erhalten. Nach McConnell ergeben sich aus diesen β -Protonen-HFSCs die Verdrehungswinkel von 63° und 55° . Diese Werte konnten bereits für das Kation- und das Neutralradikal dieser Verbindung errechnet werden (s. o.).

Wichtig scheint, daß selbst bei extrem hohen Spannungen der Elektrolyse ein Anionradikal vom Lumichrom nicht nachgewiesen werden konnte. Dies zeigt auf, warum Alloxazine keine guten Modellverbindungen für Flavine sind. Da in physiologischen Medien nur Anion- und Neutralradikale der entsprechenden Verbindungen vorliegen können, diese von Alloxazinen aber anscheinend nicht stabil sind, können Lumichrom und ähnliche Verbindungen nicht die Eigenschaften von Flavoenzymen simulieren. Für die Stabilität der Radikale scheint eine dreifache Koordination des Stickstoffatoms in Position 10 von größter Wichtigkeit zu sein. Das Alloxazin-Kationradikal, das an dieser Position protoniert ist, konnte als einzige paramagnetische Stufe nachgewiesen werden. Anion- und Neutralradikale, die dort keine Substituenten tragen, sind auch nicht bekannt.

Radikale in wäßrigen Lösungen

Von den wäßrigen Lösungen einiger Flavin- und Flavoenzym-Radikale konnten nur unaufgelöste EPR-Spektren aufgenommen werden. Die Molekular-Bewegung dieser komplexen Systeme im Lösungsmittel Wasser reicht offenbar nicht aus, die großen Anisotropien auszumitteln, so daß auch ENDOR-Spektren möglich sind. Für typische Molekulargewichte von Flavoenzymen von 10 000 (Flavodoxine) und 100 000 (Old Yellow Enzyme) ergeben sich Rotations-Korrelations-Zeiten von 3 bzw. 30 ns in wäßrigen Lösungen bei 25°C ($\tau_R = 3 \times 10^{-13} \times \text{MW}$; MW = Molekulargewicht) /177/. Somit gilt die Redfield-Näherung für schnelle Bewegungen in Lösungsmitteln /178/

$$\langle \hat{A}(t) \rangle \tau_R / \hbar < 1 \quad (42)$$

nur für anisotrope Hyperfeinkopplungen, die kleiner als 50 MHz bzw. 5 MHz sind. Da aus der Literatur /43/ (Simulationen der Pulverspektren von Flavoenzym-Radikalen) die anisotropen Werte in etwa bekannt sind ($A_1 \approx 2,5 \times a_N^{\text{iso}} \approx 50 \text{ MHz}$), kann man mit ihnen errechnen, daß die Anisotropien der Hyperfeinkopplungen in wäßrigen Lösungen bei Raumtemperatur nicht ausgemittelt werden können. Der Wechsel zu anderen, weniger viskosen Lösungsmitteln oder zu höheren Temperaturen als Raumtemperatur würde sicherlich den Proteinkomplex sehr stark verändern, wenn nicht sogar zerstören. Messungen unter diesen "ENDOR-freundlichen" Bedingungen dürften ebenfalls keine brauchbaren Ergebnisse bringen. Die einzige Möglichkeit im Augenblick, ganze Enzyme mit der Doppelresonanzmethode ENDOR zu untersuchen, besteht im Einfrieren der Radikallösungen.

4.2.3. Thiaalloxazin- und Thiaisoalloxazin-Radikale

Von dieser Gruppe von Verbindungen lassen sich ähnlich den Phenothiazinen Neutral- und Kationradikale darstellen, während Anionradikale nicht erzeugt werden konnten. Sie müßten entweder durch Reduktion des oxidierten Thiaflavins erzeugt werden oder durch Oxidation der reduzierten Stufe in einem basischen Lösungsmittel. Die oxidierte Stufe ist nicht stabil, da sie eine positive Ladung trägt und sofort mit Wasser zu einem Sulfoxid reagiert. Die Oxidation eines Thiaflavins in "ENDOR-freundlichen" basischen Lösungsmitteln ist wegen der sehr geringen Löslichkeit dieser Verbindungen ebenfalls nicht durchführbar.

Die g-Faktoren der Thiaflavin-Kationradikale sind etwas größer als die der entsprechenden Flavin-Kationradikale. In den Thiaanalogen ist ein Schwefelatom am π -System beteiligt. Infolge seiner relativ hohen Atommasse macht sich seine Spin-Bahn-Kopplung (unter Vernachlässigung des Einflusses der Spindichte am Schwefelatom sowie der Energien der beteiligten

angeregten Zustände des paramagnetischen Zentrums) durch eine geringe Vergrößerung des g-Faktors gegenüber dem des entsprechenden Flavin-Radikals bemerkbar.

Die Zuordnung der Kopplungen zu Molekülpositionen wurde mit ähnlichen Methoden wie bei den Flavin-Radikalen vorgenommen. Beim Thiariboflavin-Kationradikal war dies etwas schwieriger, da für die Untersuchungen ein Gemisch aus zwei Isomeren vorlag. Mit Hilfe des General-TRIPLE-Experimentes gelang es trotzdem, wie später ausführlich beschrieben wird. In den ENDOR-Experimenten konnte für die Thiaflavin-Radikale jeweils nur eine Stickstoffkopplung gemessen werden, da das Stickstoffatom in der Position 5 des Flavinsystems gegen ein Schwefelatom ausgetauscht ist. Das einzig magnetisch aktive Schwefelisotop ^{33}S tritt nur in einer natürlichen Häufigkeit von 0,75% auf /179/ und läßt sich unter anderem aus Empfindlichkeitsgründen mit der ENDOR-Spektroskopie nicht untersuchen. Selbst in den EPR-Spektren sind entsprechende Satellitenlinien, wie bei einigen Thiaverbindungen in der Literatur beschrieben /180/, infolge der schlechten Auflösung nicht zu erkennen. Außerdem waren bei diesen bereits untersuchten Verbindungen mehrere äquivalente Schwefelkerne im Radikal notwendig, damit die ^{33}S -Satellitenlinien im EPR-Spektrum mit ausreichender Intensität auftraten.

Die Zuordnung der Protonen-HFSCs zu den Molekülpositionen der Thiaflavin-Radikale muß nach den ENDOR-Ergebnissen der vorliegenden Arbeit anders als in der Literatur vorgenommen werden, in der Fenner et al /58/ durch EPR-Spektren-Simulationen analog den Flavinradikalen Kopplungskonstanten zu den Molekülpositionen zuordneten. Nach den vorliegenden Ergebnissen besitzt die Position 7 im Thiaflavin-Kationradikal eine relativ große Spindichte, während für Position 6 die kleinste Protonen-Kopplung gemessen wurde. Eine immerhin noch beträchtliche HFSC von fast 1 MHz ist der Methylgruppe in Position 3 zuzuordnen (s. Abb. 76).

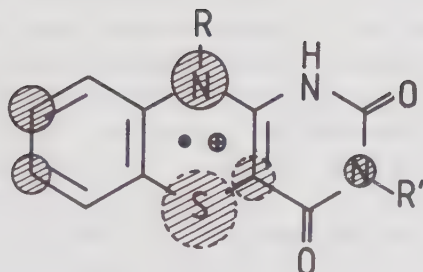


Abbildung 76. Spindichte-Verteilung im Thiaflavin-Kationradikal, Spindichten in Pos. 4a und 5 sind ungewiß

Die HFSCs werden durch die unterschiedliche Stellung von Methylgruppen im benzoiden Teil der Thiaflavin-Radikale kaum beeinflusst. Man beobachtet nur eine leichte Spindichte-Vergrößerung in Position 8 und 10 nach Methylsubstitution eines α -Protons, während alle anderen Kopplungen (z. B. Pos. 7) sich nur gering in verschiedene Richtungen ändern (s. Abb. 77).

7	8	10	
↑	↑	↑	7
↓	↑	↑	8
↓	↑	↑	10

Abbildung 77. Veränderungen der Kopplungen bei Methylsubstitution eines α -Protons bei den Thiaflavin-Radikalen, weitere Erklärung s. Abb. 72

Interessant ist der Einfluß zweier Substituenten mit elektro-nenschiebenden Eigenschaften an der Stelle hoher Spindichte (Position 8), die eingeführt wurden, um das normalerweise hohe Redoxpotential der Thiaflavine zu erniedrigen. Die Methoxygruppe bzw. eine Acetaminogruppe an dieser Stelle bewirken eine Reduzierung der Spindichten in Position 10 und eine geringe Vergrößerung der Kopplungskonstanten für die Methylprotonen der Position 7.

Eine Vergrößerung des Substituenten in Position 10 zum Benzyl-, Ethyl- oder Allylrest bewirkt infolge der behinderten Rotation dieses Restes eine starke Reduktion der Kopplungskonstanten für die entsprechenden β -Protonen. Aufgrund einer guten Auflösung konnten teilweise Aufspaltungen der ENDOR-Linien erkannt werden. Über das Hyperkonjugationsmodell wurden wieder die Winkel zwischen der CH_β -Bindung und dem p_z -Orbital des benachbarten Stickstoffatoms berechnet. Werte um 60° sprechen für nahezu äquivalente Methylenprotonen. Vom 10-Allyl-Thiaflavin-Kationradikal konnte die größte Aufspaltung der β -Protonensignale gemessen werden, die Winkel betragen hier 56° und 63° .

Am interessantesten in dieser Reihe ist die Konformation des Substituenten in Position 10 des Thiariboflavins. Leider entsteht bei der Synthese nach Fenner et al /59/ hier nur ein Isomerengemisch aus dem 7,8-Dimethyl- und dem 6,7-Dimethyl-Tetraacetyl-Thiariboflavin, das nicht aufgetrennt werden kann. Da im General-TRIPLE-Experiment nur die Resonanzlinien durch Intensitätsänderung reagieren, deren Energieniveaus durch Relaxationswege miteinander verbunden sind, also von der gleichen Spezies stammen, konnten die größeren Kopplungen den entsprechenden Isomeren zugeordnet werden. Die kleineren Protonen-HFSCs sind bei beiden Radikalen in etwa gleich.

Daraus ergibt sich, daß aufgrund des unterschiedlichen Substituenten in Position 8 (Methylgruppe oder Proton) verschiedene β -Protonenkopplungen für den Rest in Position 10 gemessen werden. Hierfür kann eine geringe Spindichteumverteilung im π -System verantwortlich sein, die aber im Falle der beiden entsprechenden Thialumiflavin-Kationradikale nicht

zu zwei unterschiedlichen HFSCs für die Protonen der 10-Methylgruppe führte. Andererseits ist ein sterischer Einfluß der 8-Methylgruppe auf den Tetraacetyl-Ribityl-Rest möglich, wie bereits im Falle des Tetraacetyl-Riboflavin-Radikals vermutet. Errechnet man nach McConnell aus den Kopplungen die Winkel zwischen der CH_β -Bindung und dem p_z -Orbital des Stickstoffatoms, so ergibt sich ein Unterschied bei den beiden Isomeren von etwa 2° , der sicherlich nicht signifikant sein dürfte. Aufgrund gleicher Meßbedingungen könnte aber qualitativ auf etwas unterschiedliche Konformationen an dieser Position geschlossen werden. Für das 7,8-Dimethyl-Isomere kann man eine Struktur wie in Abbildung 78 annehmen.

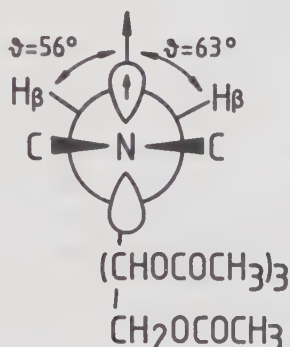


Abbildung 78. Newman-Projektion der Konformation in Position 10 des Tetraacetyl-Thiariboflavin-Kationradikals

Zu erwähnen sind noch Unterschiede der Kopplungen in den Lösungsmittelgemischen Schwefelsäure/Nitromethan und Aluminiumtrichlorid/Nitromethan /115/ gegenüber Trifluoressigsäure/Toluol. In Nitromethan sind die Kopplungskonstanten für die Protonen der Positionen 7 und 8 etwas kleiner als in Toluol/ CF_3COOH . Inwieweit eine Komplexierung durch Aluminium-Ionen oder größere Aluminiumchlorid-Komplexe des Thiaflavin-Radikals dafür verantwortlich ist, muß durch weitere ENDOR-Experimente mit anderen Metallionen noch geklärt werden. Interessanterweise tritt bei 8-Normethyl-Thiaflavin anscheinend eine andere

Radikalbildungsreaktion auf. So wird im ENDOR-Spektrum die doppelte Anzahl von Protonensignalen registriert, wenn die paramagnetische Spezies mit AlCl_3 erzeugt wurde. Aufgrund elektrophiler Alkylierungen oder auch Dimerisierungen können andere Radikale gebildet worden sein, als dies bei Oxidation durch Schwefelsäure der Fall ist.

Die Kopplungskonstanten von Neutralradikalen der Thiaisoalloxazine (Neutralradikale der Thiaalloxazine konnten nicht dargestellt werden) zeigen im wesentlichen alle kleinere Werte als die der Kationradikale. Differenzen von bis zu 1 MHz können registriert werden. Sie sind wie schon oben bei den entsprechenden Flavinradikalen durch die fehlende positive Ladung im Neutralradikal zu erklären.

Deutliche Unterschiede zwischen den Radikalen der Flavine und der Thiaflavine fallen auf beim Vergleich der Spindichten der Positionen 8, 7 und 6. Bei den Schwefelanalogen sind im benzoiden Teil die größten Kopplungen für die Protonen der Positionen 8 und 7 gemessen worden, während nur ein sehr kleiner Wert für das 6α -Proton registriert werden kann. Im entsprechenden Flavinradikal ist die 8β -Kopplung um 1,3 MHz größer. Außerdem ist hier die Protonen-HFSC für Position 6 größer als die der Position 7. Welchen starken Einfluß das Schwefelatom auf die Spindichte-Verteilung im Molekül hat, konnte schon beim Vergleich der beiden Grundkörper Phenazin- und Phenothiazin-Radikal gezeigt werden.

4.3. Ergebnisse der Messungen an gefrorenen Lösungen

4.3.1. Flavin- und Thiaflavin-Radikale

Die schnellen Bewegungen der Radikale in flüssigen Lösungen bedeuten die weitgehende Ausmittlung der Anisotropien der HFS-Kopplungen und des g-Faktors. Bei tiefen Temperaturen bzw. in festen Matrices ist diese Molekularbewegung stark eingeschränkt, so daß die anisotropen Beiträge nicht mehr ausgemittelt werden. Sie können nun aus EPR- und ENDOR-Spektren der Radikale in flüssigen Kristallen, gefrorenen Lösungen oder

in Einkristallen ermittelt werden. In flüssigen Kristallen konnten bisher nur Anion- und Neutralradikale gemessen werden /181,182/. Die Darstellung der Anionradikale von Flavinen ist allerdings bisher in diesen Lösungsmitteln noch nicht gelungen. Ebenso gibt es noch keine Methode, Kationradikale zu komplexieren, so daß sie in flüssig-kristallinen Phasen gelöst werden können. Somit kann die ENDOR-Spektroskopie am Flavin-System in diesen anisotropen Lösungsmitteln vorerst nicht durchgeführt werden.

Weiterhin sind keine Experimente bekannt, die es erlauben, an Einkristallen mit paramagnetischen Flavinzentren zu messen. Einkristalle von reinen Thiaflavinradikalen sind zwar bekannt /183/, können aber infolge des Spin-Austausches /184/ für ENDOR-Untersuchungen nicht herangezogen werden. Durch die hohe Spinkonzentration, die eine große Austauschfrequenz der Spins bewirkt, würde nur eine einzige, relativ schmale EPR-Linie beobachtet werden können.

Somit verbleibt als einzige Möglichkeit das ENDOR-Experiment an gefrorenen Lösungen der Radikale. Hier werden die Lösungen der paramagnetischen Spezies eingefroren und bei Temperaturen um 130 K spektroskopiert. Die Radikale sind darin statistisch regellos orientiert. Man hat also ähnliche Bedingungen wie in Pulvern und spricht im allgemeinen von einer "rigid matrix". Die Theorie zu den ENDOR-Messungen an regellos orientierten Radikalen haben Kevan und Hyde in einer Zahl von Veröffentlichungen dargestellt /53,73,76,77/ und teilweise schon auf Matrix-ENDOR-Untersuchungen von Flavinradikalen angewendet /43/.

Das intensivste Signal in ENDOR-Spektren von gefrorenen Radikallösungen der Flavine und Thiaflavine ist im allgemeinen das Matrixsignal. Je nach Lösungsmittel lassen sich die entsprechenden Resonanzlinien bei den freien Kernfrequenzen von Protonen, Deuteronen und Fluorkernen beobachten. Sie zeigen die rein dipolaren Hyperfein-Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons mit magnetisch aktiven Kernen in der Matrix auf. Es werden alle Kerne in einem Radius von 0,6 nm /185/ um die paramagnetischen Zentren erfaßt.

Es fällt auf, daß in perdeuterierten Lösungsmitteln (99,9% D)

auch noch ein Signal bei der freien Protonenfrequenz beobachtet werden kann. Möglicherweise wird es von der HFS-Wechselwirkung des Elektrons mit anderen diamagnetischen Ausgangsmolekülen in der Nähe der radikalischen Zentren verursacht. Somit entsteht ein Signal bei der freien Protonenfrequenz nicht nur durch die Wechselwirkung des Elektrons mit Matrixkernen, sondern auch durch die Einflüsse anderer diamagnetischer Moleküle in der Lösung.

Bei ENDOR-Untersuchungen an Di-tert.-butylnitroxid in einer $1H, 1H$ -Heptafluor-1-butanol-Matrix bei 48 K konnte das Fluor-Matrix-Signal bereits beobachtet werden /186/. Das relativ schmale Fluor-Signal in den ENDOR-Spektren der gefrorenen Lösungen von Flavin-Kationradikalen kann durch zwei unterschiedliche Wechselwirkungen des Radikals mit dem Trifluoracetatanion verursacht werden. Es kann nicht festgestellt werden, ob ein Ionenpaar aus dem Kationradikal und dem Trifluoracetatanion besteht oder ob es sich um die rein dipolare Wechselwirkung des paramagnetischen Zentrums mit der Lösungsmittelhülle handelt. Ein Kontaktionenpaar von Radikal und Gegenion, wie bei Fluorenon-Anionradikalen mit Alkalikationen von Lubitz gefunden wurde /187/, kann allerdings ausgeschlossen werden. In diesem Falle müßte eine Fluorkopplung auch in flüssigen Lösungen gemessen werden können. Somit muß in weitergehenden Untersuchungen geklärt werden, ob sogenannte "solvent-shared" oder "solvent-separated" Ionenpaare vorliegen /188/.

Interessant ist das unterschiedliche Verhalten der Matrix-Signalintensitäten bei Änderungen der Meßtemperatur und der Mikrowellenleistung. Die Intensität des Protonensignals in z. B. HCl zeigt ein Maximum bei 130 K, während die des Fluorsignals in CF_3COOH /Toluol hier ein Minimum hat und zu höheren Temperaturen stark ansteigt. Möglicherweise ist hierfür die größere dipolare Anisotropie des Fluorkernes verantwortlich ($Tr \{A^2\}_H = 3400 \varphi_H^2 \text{ MHz}^2$, $Tr \{A^2\}_F = 1,38 \times 10^7 \varphi_F^2 \text{ MHz}^2$), die ja bekanntlich großen Einfluß auf die optimale Rotations-Korrelations-Zeit und damit auf die optimale Meßtemperatur hat. Es kann nicht geklärt werden, ob noch andere Wechselwirkungs-Mechanismen der Fluorkerne mit dem Radikal (s. o.) für eine

andere Temperaturabhängigkeit des Fluor-Matrixsignals verantwortlich sind.

Ein Vergleich der beiden Diagramme (Abb. 58) zeigt, daß das Protonen-Matrixsignal in Trifluoressigsäure/Toluol nicht mehr die reine Wechselwirkung des Elektrons mit nahen Lösungsmittelmolekülen wiedergibt wie in HCl. Eine deutlich andere Kurvenform weist auf andere Mechanismen hin. Hierfür können, wie schon erwähnt, nahe gelegene diamagnetische Flavinmoleküle ebenso verantwortlich sein wie andere Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons mit den Lösungsmittelprotonen.

In organischen Lösungsmitteln wie Methylenchlorid ergeben die Festkörper-ENDOR-Messungen an gefrorenen Lösungen der Neutralradikale Matrixsignale mit geringerer Intensität als in azidem Medium. Man kann hier eine sehr viel geringere Wechselwirkung des ungeladenen Radikals mit der Solvathülle annehmen. Somit läßt die Intensität des Matrixsignals Aussagen über die Stärke der Wechselwirkung der paramagnetischen Spezies mit den umgebenden diamagnetischen Molekülen zu. Bei der Untersuchung von Enzymen sollten diese Erkenntnisse helfen, Beziehungen des Radikals zu dem Apoprotein und zu Substratmolekülen aufzuzeigen.

Wie schon von Kevan und Hyde anhand eines Beispiels beschrieben wurde /53,73,76,77/, lassen sich in den ENDOR-Spektren von gefrorenen Lösungen einiger Radikale auch intensive Absorptionssignale von Methylkopplungen nachweisen. Methylgruppen rotieren schnell um ihre Bindungsachse zum entsprechenden α -Atom des Radikals sogar bei tiefen Temperaturen in festen Matrices /76,77/. Aus diesem Grunde ist die HFS-Anisotropie der Methylprotonen unter diesen Meßbedingungen sehr gering (etwa 10% der isotropen Kopplungskonstanten), während für α -Protonen eine viel größere Anisotropie gemessen werden kann.

Die g-Faktor-Anisotropie in gefrorenen Flavinradikal-Lösungen ist gering ($\Delta g = 0,0015 / 43/$), so daß diese bei der weiteren Betrachtung vernachlässigt werden kann. Der Hauptbeitrag zur Anisotropie sollte also von den beiden ^{14}N -Kernen der Positionen 5 und 10 zu erwarten sein. Die EPR-Spektren dieser Radikallösungen lassen sich in zwei Bereiche einteilen. Im Zentrum des Spektrums werden hauptsächlich die Radikale mit Stickstoff-

kernen im Spinzustand $M_I = 0$ erfaßt, für die eine Auflösung nach den HFS-Komponenten nicht möglich ist (s. Abb. 79b). Moleküle mit Stickstoffatomen des Spinzustandes $M_I = \pm 1$ zeigen eine deutliche Unterscheidung der Komponenten im EPR-Spektrum. Hier lassen sich auf den Flanken eines Signals die Spezies mit ihren Molekülebenen senkrecht zum äußeren Feld erfassen. Im Zentrum des Spektrums werden die Radikale gemessen, deren z-Achsen senkrecht dazu eingestellt sind (Abb. 79a). In experimentellen EPR-Spektren werden allerdings alle möglichen Kombinationen der Kernspins gemessen, so daß eine Überlagerung der beiden theoretisch erwarteten Signale stattfindet (Abb. 79c). Somit werden in der Mitte des Spektrums sowohl A_I als auch A_{II} registriert, während allein auf den Flanken eine Selektion erfolgen kann.

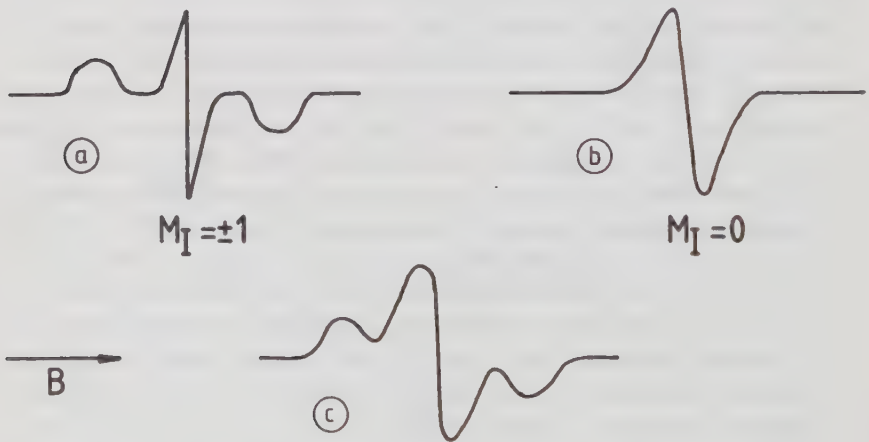


Abbildung 79. EPR-Spektrum in gefrorener Lösung für das System

$$S = 1/2, I = 1$$

- a) EPR-Spektrum für die M_I -Komponenten ± 1
- b) EPR-Spektrum für die M_I -Komponente 0
- c) EPR-Spektrum für alle Komponenten zusammen

Nach Positionierung des Magnetfeldes auf die Mitte des Spektrums würde man demnach Doppelresonanz-Spektren wie von Pulvern erhalten, die sämtliche Hyperfein-Kopplungsanteile aufzeigen. Ein entsprechendes ENDOR-Experiment nach Sättigung der "EPR-Flanke" ergibt ein einkristall-artiges ENDOR-Spektrum, das nur HFS-Komponenten parallel zur z-Achse erfaßt. Allerdings erkennt man bei den experimentellen EPR-Spektren, daß eine Auflösung, wie die hier theoretisch erläuterte, nicht immer registriert werden kann, sondern meist nur unsymmetrische und am Rand verbreiterte Signale erhalten werden können. Somit dürfte eine Selektion der Orientierungen in den EPR-Spektren nur unvollkommen sein, weshalb vollständig getrennte ENDOR-Spektren der Anisotropie-Komponenten kaum zu erhalten sind.

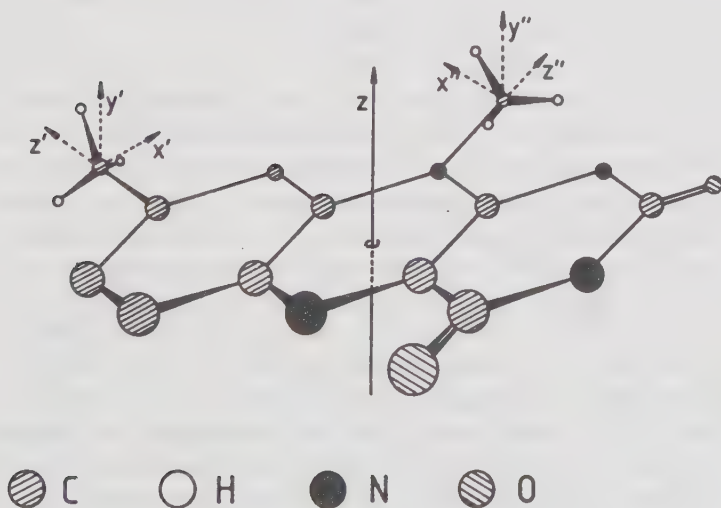


Abbildung 80. Struktur des Flavin-Radikals; Stellung des Molekülachsensystems xyz sowie der Achsensysteme für die Methylgruppen $x'y'z'$ und $x''y''z''$

Zur Auswertung der Festkörper-ENDOR-Spektren von Flavinradikalen müssen die anisotropen Beiträge $A_{\parallel}$ und $A_{\perp}$ festgestellt werden. So muß man annehmen, daß die Bindungsachsen der Methylgruppen in den Positionen 3, 7, 8 und 10 senkrecht zum π -System, d. h. senkrecht zur z-Achse des Molekülgerüsts stehen. Da im ENDOR-Spektrum nach Sättigung der EPR-Flanke nur Komponenten parallel zur z-Achse des Radikals erfaßt werden, wird man hier nur die $x'y'$ -Beiträge der Methylkopplungen, also $A_{\perp}$ messen können (s. Abb. 80).

Die registrierten ENDOR-Spektren zeigen für Signale der Methylprotonen Aufspaltungen, wie sie zwei Vorzugsorientierungen entsprechen würden. Nach Positionierung des EPR-Feldes auf das Zentrum des Absorptionssignals lassen sich also die z' - und $x'y'$ -Komponenten der Kopplungen messen (es wird von einem rotationssymmetrischen HFS-Tensor ausgegangen). Die Positionierung auf die Flanke des EPR-Spektrums ergibt im ENDOR-Spektrum allein die $x'y'$ -Komponente.

So werden für alle Radikale anisotrope Methylkopplungen gemessen, die um die isotropen Kopplungen liegen. Aus ihnen läßt sich die isotrope HFSC in der gefrorenen Lösung als gewichteter Mittelwert der anisotropen Komponenten errechnen. Zumindest bei den Flavin-Radikalen sind die experimentellen und errechneten isotropen Daten sehr ähnlich, während bei den Thiaflavinradikalen Abweichungen auftreten. Diese sind auf verschiedene Lösungsmittel und/oder auch unterschiedliche sterische Verhältnisse in den festen Matrices zurückzuführen.

Voluminöse Substituenten im Radikal können unter diesen Bedingungen nicht mehr schnelle Rotationen um ihre Bindungsachse zum α -Atom durchführen. Die HFS-Anisotropie der β -Protonenkopplungen wird dann sehr groß. Entsprechend können für sie keine Linien im ENDOR-Spektrum der gefrorenen Lösungen registriert werden. Im allgemeinen ist dann nur noch eine Kopplung von etwa 5 MHz zu beobachten. Da im Festkörper-ENDOR-Spektrum des 6,9- d_2 -Lumiflavin-Kationradikals diese Kopplung nicht mehr registriert wird, muß sie dem α -Proton in Position 6 zugeordnet werden. Anscheinend ist die Anisotropie dieser Kopplung äußerst gering, denn weitere HFS-Komponenten können nicht beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse konnten bereits beim Phenalenyl-

Radikal in Durol gefunden werden /189/, wo für eine Protonen-Kopplung im Festkörper-Spektrum ein Linienpaar wie in isotropen Lösungen gefunden wurde. Hier war allerdings eine rasche Molekülrotation für diese "isotropen Linien" verantwortlich.

Da das Neutralradikal des Lumiflavins aus Stabilitätsgründen in Position 5 eine weitere Methylgruppe trägt, sollte im ENDOR-Spektrum der gefrorenen Lösung ein neues Linienpaar auftreten. So ist im hochfrequenten Bereich auch eine sehr breite Linie zu erkennen, die allerdings nicht weiter aufgespalten ist. Die Verhältnisse an diesem Stickstoffatom müssen also anders als bei anderen methylsubstituierten Positionen im Radikal sein. Da die unterschiedliche Positionierung im EPR-Spektrum nicht zu unterschiedlichen ENDOR-Signalen für diese Methylprotonen führt, kann man annehmen, daß an dieser Molekülposition eine andere Konformation als bei den Methylgruppen der Positionen 7, 8 und 10 vorliegt. Dafür spricht auch die Tatsache, daß veränderte HFSCs gemessen werden, wenn das Neutralradikal ohne Substituenten in Position 5 in gefrorenen Lösungen untersucht wird. Wie schon vorher beschrieben, weist auch die große isotrope Stickstoffkopplung von N-5 auf andere sterische Verhältnisse hin. Im Übrigen fehlt das Methylsignal im ENDOR-Spektrum, nachdem die Lösung angesäuert wurde. Möglicherweise wird die Methylgruppe in Säuren abgespalten und durch ein Proton ersetzt. So ist aus der Literatur durchaus bekannt, daß im sauren Medium eine Dealkylierung an dieser Position stattfinden kann /190,191/.

In der Reihe der verschieden protonierten Stufen des FMN-Radikals sind Unterschiede in den Methylprotonen-Kopplungen zu erkennen. So nimmt die Kopplung an Position 8 vom Anion- über das Neutralradikal zum Kationradikal stark zu, was auf den Einfluß der verschiedenen Ladungen und des Protons in Position 5 zurückzuführen ist. Die Eigenschaft der 8-Methyl-HFSC, auf pH-Änderungen zu reagieren, kann bei der Diskussion von ENDOR-Ergebnissen der Enzymradikale ausgenutzt werden. Man sollte die Anion- und Neutralradikale der Coenzyme gut unterscheiden können. Da der Protonierungszustand des Radikals in Proteinen hauptsächlich durch die Bindungen des Apoproteins zu den Posi-

tionen 1 und 5 gesteuert wird, müßten Aussagen über Apoenzym-Coenzym-Wechselwirkungen möglich sein.

Interessanterweise unterscheiden sich die Kopplungen der statistisch regellos orientierten Radikale schon in verschiedenen Lösungsmitteln. So nimmt die Kopplungskonstante für die Methylgruppe in Position 8 mit der Säurestärke des Mediums zu, was wieder die Empfindlichkeit dieser HFSC gegenüber Änderungen der Umgebung dokumentiert. Sicherlich spielen sowohl die Säurestärke als auch die Größe des Gegenions für das Radikal eine Rolle. Zumindest bei ähnlich großen Gegenionen wie Trichloracetat- und Trifluoracetat-Anion ist aber gut zu erkennen, daß die stärkere Säure, die damit auch stärker protonierend wirkt, zu größeren Kopplungen sowohl für die 10- als auch für die 8-Methylprotonen führt. Der Vergleich mit HCl und DCl dürfte allerdings schwieriger sein, da das Chlorid-Anion sicherlich anders fungiert als die Acetat-Anionen, wie bereits an den Matrix-Signalen zu erkennen ist.

Bevor die ENDOR-Ergebnisse von gefrorenen Lösungen der Enzymradikale diskutiert werden, soll hier kurz zusammengefaßt werden, welche Erkenntnisse aus den ENDOR-Messungen der gefrorenen Lösungen von Flavin-Radikalen gewonnen werden können. In ENDOR-Experimenten an gefrorenen Lösungen lassen sich Signale für Dipol-Dipol-Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons mit Matrixkernen und auch mit Kernen von diamagnetischen Ausgangsmolekülen in der Nähe der Radikale beobachten. Die Intensität dieses Signals kann Aussagen über die Stärke der Wechselwirkung der Radikale mit der umgebenden Lösungsmittelhülle zulassen.

Weiterhin können Daten über die isotropen und anisotropen HF-S-Komponenten von Methylprotonen gewonnen werden. Die Positionierung des EPR-Feldes auf den Rand eines EPR-Spektrums läßt die Aufnahme von einkristall-artigen ENDOR-Spektren zu, so daß nach z- und xy-Komponenten der Kopplungen unterschieden werden kann. Da dies für alle in den Radikalen vorhandenen Methylgruppen gleichermaßen gilt (ausgenommen die Methylgruppe in Position 5 der Neutralradikale), sollten die Radikale ebenso wie die oxidierte Flavinstufe annähernd planar sein. Als drittes

können Signale von α -Protonen mit sehr geringer Anisotropie registriert werden. Die Größe aller Kopplungen läßt Rückschlüsse auf den Protonierungszustand der Radikale zu.

4.3.2. Radikale der Enzyme

Bei den Radikalen der Flavoenzyme liegen andere Verhältnisse als bei denen der Modellverbindungen vor. Hier sind die radikalischen Zentren, Isoalloxazin-Anion- oder Neutralradikale, in eine "Proteintasche" eingebaut. Die Bindung des Coenzym zum Apoprotein kann kovalent sein (z. B. Succinat-Dehydrogenase). Im allgemeinen werden jedoch mehr oder weniger starke Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Positionen 1 und 5 des Flavins und den polaren Gruppen des Proteins angenommen. Somit sind für ENDOR-Untersuchungen eher die Bedingungen in der Proteinhülle wichtig bzw. die Größe des Holo-Enzyms als z. B. der pH-Wert des umgebenden Lösungsmittels.

Betrachtet man die ENDOR-Spektren der gefrorenen Lösungen von Enzym-Radikalen, so erkennt man sofort einige Unterschiede zu den Spektren der Modellverbindungen und Coenzyme. Einerseits sind die Intensitäten der Matrixsignale im allgemeinen geringer, andererseits treten schmalere Methyl-Resonanzlinien auf, so daß auch für die 8-Methylgruppe Aufspaltungen noch gut zu erkennen sind. Es ist bekannt /42/, daß starke Wechselwirkungen der Radikale mit den Lösungsmittelmolekülen zu intensiven Matrixsignalen und zu breiten Methylsignalen führen, wie dies bei den freien Coenzymradikalen auch gefunden wird. Ähnliche Verhältnisse müssen auch bei den gemessenen Flavodoxin-Radikalen vorliegen. Die ENDOR-Spektren weisen relativ intensive Protonen-Matrixsignale auf und breite Resonanzlinien für die 8-Methylprotonen, die eine Aufspaltung gerade noch erkennen lassen. Von Flavodoxinen weiß man auch, daß die Beweglichkeit der Flavine in der Proteinhülle dieser reinen Elektronen-Transferasen sehr gering und ihre Komplexierung sehr stark ist. Die aktiven Zentren zeigen deshalb starke Wechselwirkungen mit dem umgebenden Wasser. Dies führt zu ENDOR-Linienbreiten der 8-Methylgruppe von 300 KHz. Eine relativ große Anzahl von Wassermolekülen

in der Nähe des Radikals und eingeschränkte Beweglichkeit führt zu den intensiven Matrix-ENDOR-Signalen. Die Situation ist ähnlich beim Old Yellow Enzyme.

Anders sind nur die ENDOR-Spektren der Radikale der Methanol-Oxidase mit dem Coenzym FAD. Hier erhält man kleine Matrix-signale und für dieses Experiment extrem schmale Resonanzlinien für Methylprotonen (100 KHz). Dies bedeutet, daß die Flavinradikale innerhalb der Proteinhülle eine große Beweglichkeit besitzen und gegen das Lösungsmittel durch eine hydrophobe Wand des Apoproteins gut abgeschirmt sind. Nachdem vor kurzem die These vorgestellt wurde, daß die Beweglichkeit der prosthetischen Gruppe im Protein die Enzymaktivität steuern kann /192/, könnten diese und weitere Untersuchungen an diesem Problem einen Beitrag zu dieser Diskussion liefern.

Die Extraktion der Coenzyme aus den Proteinhüllen ergab FMN als prosthetische Gruppe der Flavodoxine /144,193/ und der NADPH-Dehydrogenase (Old Yellow Enzyme) /148,149/. Methanol-Oxidase dagegen enthält FAD /145,146/. Weiterhin wurden die Absorptionsspektren der Radikale aufgenommen /134,194/. Es konnte die rote Farbe der Anionradikale im Old Yellow Enzyme und in der Methanol-Oxidase festgestellt werden, während bei Flavodoxinen die blaue Farbe des neutralen Flavinradikals auftritt. Wie schon anhand des FMN-Radikals beschrieben, unterscheiden sich die 8-Methylkopplungen der beiden protonierten Formen des Coenzymradikals deutlich in ihrer Größe. Die Kopplung ist beim Anion um 3 MHz größer als bei der neutralen Spezies. Die Ergebnisse der ENDOR-Experimente an gefrorenen Enzymradikallösungen geben demnach auch die Erkenntnisse der UV/VIS-Spektren wieder.

Selbstverständlich sind die Verhältnisse in Enzymen bezüglich eines bestimmten pH-Wertes anders als in der wäßrigen Lösung eines freien Coenzymradikals. Sofern noch von einem pH-Wert in der Proteinhülle gesprochen werden kann, wird dieser durch azide Protonen von NH-, SH- und COOH-Gruppen der Aminosäuren bestimmt. Somit hängt der Protonierungszustand des Flavins von der Koordinierung des Stickstoffatoms in Position 5 ab. Zur Erinnerung: Ist N-5 durch ein zusätzliches Proton oder eine

Methylgruppe blockiert, so entsteht das stabile Kation- bzw. Neutralradikal. Sie zeigen ähnliche HFS-Werte. Ist diese Position nur zweifach koordiniert wie bei Anionradikalen, besteht eine völlig andere Spindichtevertelung.

Die Blockierung des Stickstoffatoms in Position 5 dürfte in Enzymen durch aktive Stellen der Proteinhülle übernommen werden. So zeigen Enzyme mit natürlich vorkommenden Radikalen (e-Transferasen) die Kopplungen eines Neutralradikals. Die starke Komplexierung und geringe Beweglichkeit ihrer paramagnetischen Zentren sind bekannt. Alle Befunde deuten demnach auf eine bindungsartige (Komplexbindung) Wechselwirkung des Proteins mindestens zu N-5 hin (Abb. 81). Dies erklärt die Stabilität der Flavodoxin-Radikale und ihre katalytische Wirksamkeit. Eine Reaktion über die Position 5 und/oder 4a ist demnach nicht möglich. Es bleibt als mögliches reaktives Zentrum der benzoide Teil des Flavinradikals mit der höchsten Spindichte in Position 8 wie von Hemmerich vorgeschlagen /195/.

Durch Photoreduktion können von Dehydrogenasen artifizielle rote Radikale erzeugt werden. Von ihnen ist die Instabilität, die relativ hohe Beweglichkeit und die starke Wechselwirkung mit Wassermolekülen bereits diskutiert worden. Die Position 5 ist wahrscheinlich hier nicht komplexiert, so daß Reaktionen über diese Stelle zum Abbau des Radikals führen können. Somit bleibt hier die relativ schwache Fixierung des Coenzyms im Protein über die Positionen 1 und 3 übrig. Eine paramagnetische Zwischenstufe ist nicht stabil und kommt in der Natur nicht vor. Diese Enzyme sind vielmehr für den Hydridtransfer prädestiniert. Somit können sich aus diesen Ergebnissen als aktive Zentren beim Ein-Elektronen-Transfer die Position 8 und beim Hydridtransfer die Positionen 5 oder 4a ergeben /196/. Allerdings muß ein Elektronentransfer nicht über bestimmte Molekülpositionen verlaufen. Ebenso sind Übertragungen von Elektronen über Enzym-Substrat-Komplexe (z. B. Charge-Transfer-Komplex) denkbar.

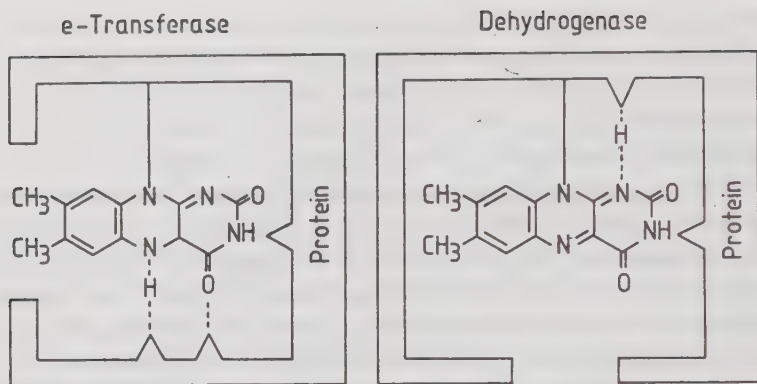


Abbildung 81. Einbau eines Isoalloxazins in ein Protein bei

a) e-Transferasen

b) Dehydrogenasen

Bei der Methanol-Oxidase kann auch diskutiert werden, ob in der "Proteintasche" nicht ähnliche Bedingungen für das Flavinderadikal wie in flüssigen isotropen Lösungen herrschen. Es ist durch eine hydrophobe "Proteinwand" gegen Wassermoleküle abgeschirmt, so daß sich schwache Matrixsignale ergeben. Weiterhin ist die Beweglichkeit innerhalb dieser Hülle größer als bei den anderen beschriebenen Enzymen. Somit können einige Wechselwirkungen zum Protein ausgemittelt werden. Schmale Methyl-ENDOR-Linien sind die Folge.

Im Falle der Methanol-Oxidase ergibt sich noch ein weiterer interessanter Aspekt. Im ENDOR-Spektrum des Radikals treten nach Zugabe von Hydroxylamin als Pseudosubstrat /147/ zur paramagnetischen Probe außer den Signalen für $\text{FAD I}^{\bullet+}$ weitere 8-Methyl-Protonensignale von einer zweiten Flavinsorte $\text{FAD II}^{\bullet+}$ auf. Anscheinend bestehen unter diesen Bedingungen zwei Arten von FAD-Anionradikalen.

Von dem Enzym ist bekannt, daß es aus acht Untereinheiten besteht, welche jeweils als prosthetische Gruppen ein FAD-Molekül enthalten. Das Radikal der Methanol-Oxidase ist katalytisch inaktiv und kann durch Photoreduktion nur in einer

Ausbeute von etwa 30% erhalten werden. Hydroxylamin, ein isoelektronisches und isosterisches Molekül zum Substrat Methanol, bewirkt eine Erhöhung der Radikalkonzentration in der Lösung auf etwa 95%. Möglich ist eine Komplexierung des FAD-Anionradikals durch die Lewis-Base Hydroxylamin. Allerdings kann eine Radikalbildung von isoliertem FAD mit dem Substrat nicht beobachtet werden. Es konnte bisher auch nicht geklärt werden, ob infolge Hydroxylaminzugabe zur Probe eine andere Umgebung und damit andere Protein-Radikal-Wechselwirkungen zum Entstehen einer zweiten Radikalart führt oder ob auch im diamagnetischen Enzym zwei oder mehrere Sorten von FAD-Molekülen vorhanden sind, die verschiedene Reaktivitätsstufen gegenüber Substraten aufweisen.

In diesem Zusammenhang werden weitere ENDOR-Untersuchungen an diesen und anderen Flavoenzymen durchgeführt /197/, um zu lernen, aus den Kopplungskonstanten und ENDOR-Linienformen noch mehr Informationen über die Enzyme zu erhalten.

5. Experimenteller Teil

5.1. Instrumentation

5.1.1. Massenspektrometer

Die Aufnahmen der Massenspektren zur Bestimmung der Fragmentierungen der Moleküle und der Molmassen wurden mit den doppelt fokussierenden Massenspektrometern Varian MAT 112 S (80 eV) sowie Varian MAT CH5-DF (70 eV) durchgeführt und die Ergebnisse teilweise mit einem Galvanometerschreiber registriert und teilweise durch einen Rechner ausgedruckt. Die Fragmentierungen wurden weiterhin durch die Verfolgung des unimolekularen Zerfalls im 1. feldfreien Bereich mit dem Spektrometer Varian MAT 711 gesichert. Die Ionisierung zur Bildung von Kationradikalen erfolgte durch Elektronenstoß mit den oben angegebenen Energien von 70 bis 80 eV.

5.1.2. NMR-Spektrometer

Die Kernresonanzspektren wurden an einem 270-MHz-Spektrometer WH 270 der Firma Bruker oder an einem 100-MHz-Spektrometer XL-100 der Firma Varian registriert. Als innerer Standard diente im allgemeinen Tetramethylsilan (TMS). Die Lösungsmittel waren CDCl_3 , DMSO-d_6 oder CF_3COOH .

5.1.3. EPR- und ENDOR-Spektrometer

Die EPR-Spektren wurden mit einem X-Band-EPR-Spektrometer Bruker ER 200 D in Verbindung mit einem AEG-20-XT-Magneten und einem EPR-Resonator Bruker 4105 bzw. mit dem unten beschriebenen EPR-Teil des ENDOR-Spektrometers aufgenommen. Die Frequenzmodulation des Feldes war 100 KHz bzw. 12,5 KHz. Die Temperatur der Probe wurde durch eine Temperiereinrichtung der Firma Bruker ER 4111 VT oder VT 1000 auf 2 K genau geregelt. Zur Feldmessung diente eine Bruker Feldmeßsonde B-NM 12 mit einem Frequenzzähler.

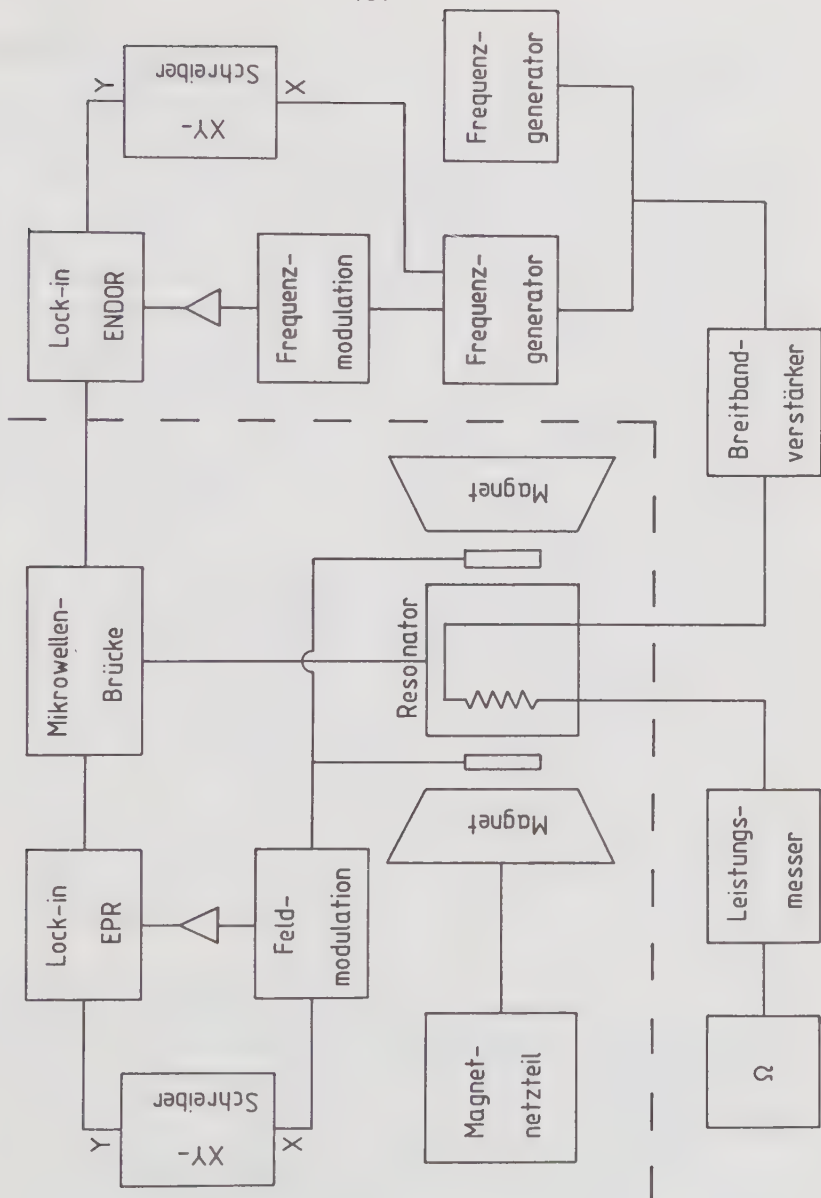


Abbildung 82. Blockschaltbild des EPR- und ENDOR-Gerätes, Erläuterungen siehe Text

Die ENDOR-Messungen wurden an einem Bruker EPR-Spektrometer ER 220 D mit entsprechender Zusatzelektronik durchgeführt (s. Abb. 82). Der EPR-Teil bestand aus einem $20'' = 50 \text{ cm}$ -Magneten, der Magnet-Energieversorgung B-MN 120/125, einem wassergekühlten 800 mW-Klystron mit einem ENDOR-High-Power-Resonator ER 200 ENB, der Stickstoff-Temperiereinrichtung B-VT 1000 und einer Arbeitskonsole, an der das EPR-Spektrum durch eine Rapid-Scan-Einrichtung auf einem Oszilloskopen sichtbar gemacht oder mit einem XY-Schreiber aufgezeichnet werden konnte. Die Frequenzmodulation des Feldes war im allgemeinen 12,5 KHz, wurde aber während des Registrierens eines ENDOR-Spektrums ausgeschaltet. Die Feldstabilität wurde mit einem Field-Frequency-Lock (FFL) gesteigert.

Die RF-Frequenz (1 bis 35 MHz) wurde von einem Synthesizer hp 8660 C erzeugt und war rechteckförmig (10 KHz) mit einer Amplitude von 50 KHz bis 100 KHz von einem Ithaco Lock-In-Verstärker frequenzmoduliert. Nach Verstärkung durch zwei gekoppelte Breitbandverstärker ENI A-300 oder einem BUS ENI A-500 wurde die Frequenz auf eine Silberspule, die um das Quarz-Temperierrohr gewickelt war, in der sich die paramagnetische Probe befand, gegeben und mit 50 Ohm abgeschlossen. Das Feld der RF-Frequenz betrug am Ort der Probe etwa 0,4 mT bis 0,5 mT im rotierenden Koordinatensystem.

Das ENDOR-Spektrum wurde mit einem Nicolet Averager 1174 aufgezeichnet bzw. akkumuliert. Bis zu 128 Durchläufe bei einer Zeitkonstanten von 40 ms waren dazu notwendig, so daß für ein Spektrum bis zu einer Stunde Meßzeit notwendig war (1 scan = 30 s).

Die für das TRIPLE-Experiment benötigte zweite RF-Frequenz wurde mit einem Frequenzgenerator hp 675 A erzeugt und durch einen Summierer zur ENDOR-Frequenz gemischt.

5.1.4. Spektrensimulation

Die EPR-Spektren wurden mit den Kopplungskonstanten aus den ENDOR-Experimenten durch das Programm GRPH /198/ simuliert und mit einem Plotter ausgedruckt.

5.2. Radikalerzeugung

Wenn nicht anders beschrieben, wurden für ENDOR-in-Lösungs-Experimente die Radikalvorstufen in vorher gereinigten und über Natrium oder über einer Natrium/Kalium-Legierung getrockneten Lösungsmitteln und ein Radikalbildner getrennt in die Vorratsgefäße a und b einer Glasapparatur (s. Abb. 83) bei 10^{-5} mbar an dem extra für Kationradikale konstruierten Hochvakuumumpstand (Abb. 84) von gelöstem Sauerstoff befreit und eingeschmolzen und erst kurz vor der Messung miteinander gemischt. Die Radikalkonzentration konnte durch Destillation des Lösungsmittels in diesem Glasgefäß variiert werden.

Für ENDOR an gefrorenen Lösungen wurden die Radikallösungen in Quarzküvetten eingefroren.

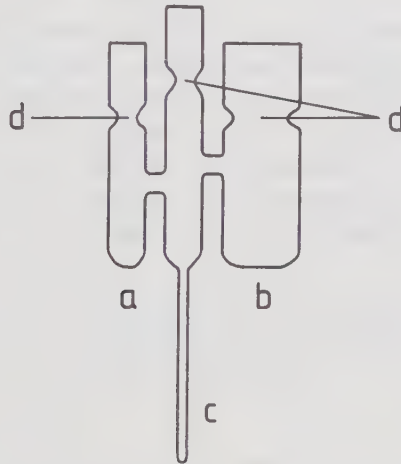


Abbildung 83. Hochvakuum-Glasgefäß ("Spinne") zur Darstellung und Aufbewahrung von empfindlichen Radikalen
 a = Vorratsgefäß für Radikalbildner
 b = Vorratsgefäß für die Lösung der Substanz
 c = Meßröhrchen
 d = Abschnürstellen

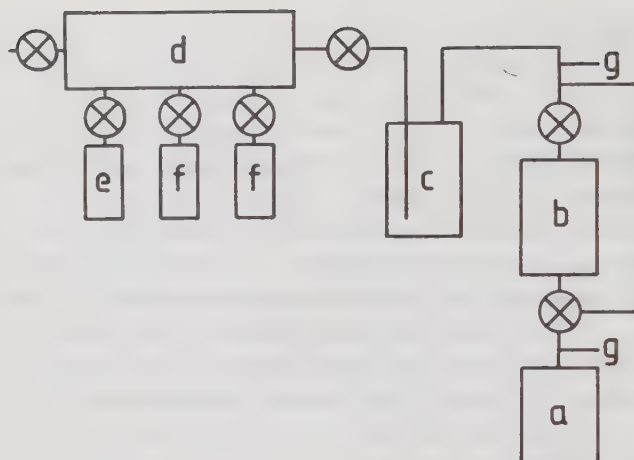


Abbildung 84. Blockschaltbild des Hochvakuumpumpstandes

a = Drehschieberölpumpe (Fa. Edwards)

b = Öl-Diffusionspumpe (Fa. Edwards)

c = Kühlfalle , d = Rezipient

e = Anschlußstelle für "Spinne"

f = Anschlußstelle für Lösungsmittelkolben

g = Meßstellen für Vakuummeßröhren (Thermovac TR 201, Penningvac PR 31, beide Fa. Leybold)

5.2.1. Alloxazin- und Isoalloxazin-Radikale

Kationradikale

ENDOR-Experimente wurden an den flüssigen Lösungen der Vorstufen der Radikale in Trifluoressigsäure/Toluol, Deuterotri-fluor-essigsäure/Toluol- d_8 oder Trifluoressigsäure/Methylen-chlorid nach Reduktion mit Natriumdithionit /21,30/ oder Zinkgranulat /34/ durchgeführt. Die Temperatur der Proben während der Messungen betrug 260 K bis 310 K im Falle von Toluol als Gemischkomponente, da bei tieferen Temperaturen die Trifluoressigsäure mit den in ihr gelösten Radikalen aus-kristallisierte, während mit Methylenchlorid auch Temperaturen

bis 220 K ohne diese Ereignisse erreicht werden konnten. Andere organische Lösungsmittel wie Chloroform, Ethanol oder Nitromethan ergaben geringere Radikalkonzentrationen oder waren für ENDOR weniger geeignet, während andere Säuren wie Trichlor-essigsäure, Ameisensäure oder Quadratsäure entweder zu schwach oder bereits bei noch zu hohen Temperaturen mit dem anderen Lösungsmittel nicht mehr mischbar waren.

Die gefrorenen Lösungen der Radikale in HCl, DCl, CF_3COOH oder CCl_3COOH bzw. die letzten beiden als Gemisch mit Toluol ergaben gute Pulverspektren.

Neutralradikale

Gelöst in Methylenchlorid oder Chloroform wurden die Isoalloxazine mit einer neutral gepufferten, wässrigen Natriumdithionit-Lösung bis zur Dihydrostufe (erkennbar an der rotbraunen Farbe) reduziert. Die organische Phase wurde in Methyljodid gegeben und in Gegenwart von Triethylamin in Position 5 methyliert. Flavine ergaben nach Reoxidation des 5-Methyl-Dihydroflavins mit Iod oder Sauerstoff relativ stabile Radikale, die nun in ein Vakuumgefäß eingeschmolzen wurden. Alloxazine ließen sich nicht in eine neutrale paramagnetische Stufe überführen.

Für Messungen in gefrorenen Lösungen wurde entweder das Flavin vorsichtig zum Radikal reduziert und die Lösung eingefroren, oder es wurde das stabilere in Position 5 methylierte Radikal in gefrorener Lösung untersucht.

Anionradikale

Zur Darstellung der Isoalloxazin-Anionradikale wurden mehrere Methoden angewendet, während Alloxazin-Anionradikale nicht erzeugt werden konnten.

Die Reaktion der Flavine in DMF mit tertiärem Butylat /110/ ergab nur wenig stabile Radikale, die bald zu einer ebenfalls paramagnetischen dimeren Stufe weiterreagierten.

Nach einer neueren Methode von Kaim et al /199/ konnten nach

der Reduktion der Flavine in THF mit Phenylmagnesiumbromid oder n-Butyl-Lithium Anionradikale in guten Ausbeuten erhalten werden, die allerdings durch entsprechende Komplexbildung mit dem beteiligten Metall-Kation stabilisiert wurden.

Für Messungen von gefrorenen Lösungen von $\text{FMN}^{\bullet-}$ und $\text{FAD}^{\bullet-}$ war die Reduktion der Ausgangsverbindungen in 0,1 N NaOH durch Natriumdithionit möglich.

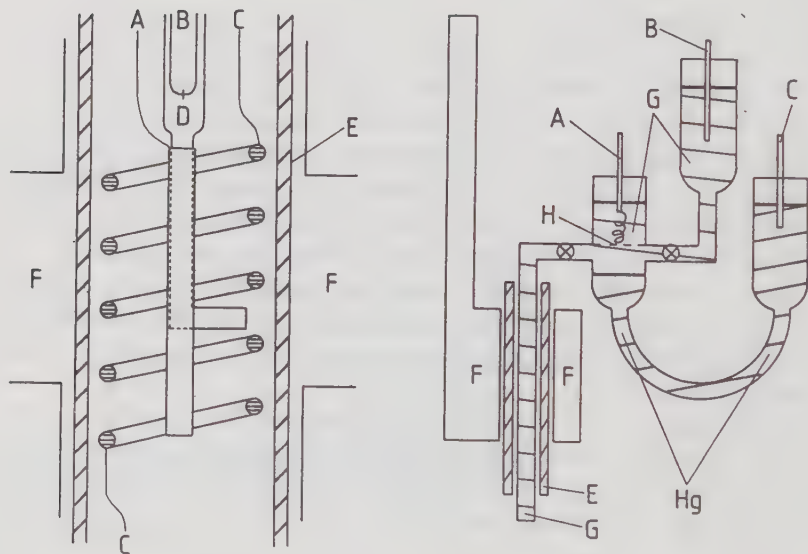


Abbildung 85. a) interne Elektrolysezelle für den EPR-Resonator
 b) externe Elektrolysezelle für ENDOR-Messungen
 A = Gegenelektrode ; B = Referenzelektrode
 C = Arbeitselektrode ; D = Kapillare für B
 E = Temperierrohr ; F = Resonator
 G = Meßrohr für ENDOR-Messungen

Im EPR-Resonator konnten die Anionradikale elektrolytisch mit einem Bruker Spannungsgenerator in einer Elektrolysezelle (s. Abb. 85a) mit einer Spannung von etwa 1 V erzeugt werden /112/. Der EPR-aktive Raum für die spektroskopischen Messungen war allerdings nur der Zwischenraum zwischen den Windungen der Arbeitselektrode C und der Wandung des Quarzrohres E, der Abstand betrug etwa 1/8 mm. Die helixartig aufgewickelte Arbeitselektrode bestand aus Platin ebenso wie die Nadel der Gegenelektrode A, die sich innerhalb der Helix befand. Die Referenzelektrode B (Silberdraht) außerhalb der Arbeitselektrode war durch eine Kapillare D mit der Lösung im elektrolytisch aktiven Teil der Zelle verbunden.

Für ENDOR-Experimente konnten die Flavin-Anionradikale nach Allendoerfer in einer externen Zelle durch elektrolytische Reduktion in HMPA und $\text{TBA}^+\text{BF}_4^-$ als Leitsalz an einer Quecksilber-elektrode C mit Platin als Gegenelektrode A und einer Silberdrahtreferenzelektrode B dargestellt werden (s. Abb. 85b). Waren allerdings geringe Konzentrationen von basischen Verunreinigungen im Lösungsmittel, so konnte ebenfalls nur eine paramagnetische dimere Spezies ohne Elektrolyse nachgewiesen werden, wie bereits in der Literatur beschrieben /32/.

5.2.2. Flavoenzymradikale

Die Radikallösungen der Flavoenzyme wurden von Herrn N. Bretz nach folgenden Methoden für seine Diplomarbeit hergestellt /197/.

NADPH-Dehydrogenase

Nach der in der Literatur beschriebenen Isolierung der NADPH-Dehydrogenase (Old Yellow Enzyme) /150/ wurde eine wäßrige, sauerstofffreie Lösung von 1,1 mM Enzym in 100 mM EDTA und 20 mM Tris-Puffer für 80 min mit dem sichtbaren Licht zweier Diaprojektoren (2 x 250 W) bestrahlt und zur Vermeidung der Aufwärmung der Probe mit Wasser temperiert.

Flavodoxine

Die wäßrigen, mit Stickstoff gespülten Lösungen der Flavodoxine von *Azotobacter vinelandii* bzw. *Megasphaera elsdenii* (von Herrn F. Müller zur Verfügung gestellt) wurden anaerob mit einem bzw. zwei Äquivalenten einer wäßrigen Natriumdithionit-Lösung versetzt und so die radikalische Stufe dargestellt /144, 200/.

Methanol-Oxidase

Eine von Kroneck und Geissler isolierte und in 30 mM Phosphat-Puffer (pH = 7,5) hergestellte Lösung von 0,35 mM Methanol-Oxidase /114,201/ aus *Candida boidinii* enthielt nach der Isolierung ca. 30% eines Radikals. Nach Zugabe von einer Lösung von Hydroxylamin als Hilfssubstrat konnte die Radikalkonzentration auf etwa 80% erhöht werden.

5.2.3. Thiaalloxazin- und Thiaisoalloxazin-Radikale

Kationradikale

Die Lösungen der entsprechenden Thiaflavine in Trifluoressigsäure/Toluol im Verhältnis von etwa 1 : 20 wurden mit etwas Dibenzoylperoxid oxidiert, so daß das Radikal entstand /113/.

Ebenso möglich, wenn auch mit Nebenreaktionen, war die Umsetzung der Vorstufe in Nitromethan mit Aluminiumtrichlorid oder konzentrierter Schwefelsäure /114,115/.

Für Festkörper-ENDOR-Spektren konnten einige Thiaflavine auch in HCl mit Dibenzoylperoxid oxidiert werden.

Ein Thialumichrom-Kationradikal (7,8-Dimethyl-Thiaisoalloxazin-Kationradikal) konnte nur in geringer Menge direkt nach Umsetzung des entsprechenden Anilinouracils mit Thionylchlorid erhalten werden /117/. Verschiedene, von Grauert dargestellte /107/ Thiaalloxazine konnten ebenso wie Thiaisoalloxazine durch Dibenzoylperoxid zur paramagnetischen Stufe oxidiert werden.

Neutralradikale

Nach Literaturvorschrift /58/ wurde das Thiaflavinium-Perbromid durch Zutropfen von Brom in Eisessig zum Thiaflavin unter Rückflußkochen dargestellt und abgesaugt. Nach Waschen mit Diethylether wurde das Radikalperbromid in Methylenchlorid suspendiert und mit 2,6-Lutidin neutralisiert. Nach Stehenlassen über Nacht und Einengen konnte das Dimere isoliert und mit Ether und Wasser gewaschen werden. Nach Trocknung ergab dieses Dimere in Chloroform eine relativ gute Konzentration des Radikals bei 300 K und konnte nach schnellen Abkühlen auf 260 K auch mit ENDOR untersucht werden.

Für Festkörper-Spektren wurde eine Lösung des Dimeren in geschmolzenem Durol hergestellt und anschließend schnell auf 130 K abgekühlt.

Die Oxidation des Thiaflavins in einem Gemisch aus DMSO und Toluol mit Bleidioxid ergab eine geringe Konzentration des Neutralradikals.

5.3. Darstellung der Substanzen

Einige Thiaalloxazine und Thiaisoalloxazine wurden freundlicherweise von Herrn R. Grauert vom Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin zur Verfügung gestellt. Ein Großteil der deuterierten Verbindungen wurden von Herrn M. Elsner /117/ aus den entsprechenden deuterierten Anilinen dargestellt, während die ^{13}C - und ^{15}N -markierten Verbindungen von Herrn F. Müller aus Wageningen/Holland für die Messungen zur Verfügung standen.

Die Enzyme wurden von den Damen und Herren Geissler, Kroneck (Konstanz), Müller (Wageningen) und Bretz (FU Berlin) isoliert. Allen sei an dieser Stelle für die zur Verfügung gestellten Substanzen und weiterreichende Diskussionen gedankt.

Im folgenden sollen die Synthesen der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten Verbindungen kurz beschrieben werden. Einige Substanzen sind bereits aus der Literatur bekannt, dort allerdings teilweise nicht durch Schmelzpunkte, Analysen oder Spektren charakterisiert worden.

N-Methyl-benzolamine (N-Methyl-aniline)(4):

Variante a)

Die besten Ausbeuten ergaben sich durch Nachvollziehen der Vorschrift von Hemmerich et al /202/, nach der 3,4-Dimethyl-anilin in Pyridin mit p-Toluolsulfochlorid umgesetzt wurde, anschließend in 2 N NaOH und Methanol zweimal mit Dimethylsulfat methyliert und zum Schluß mit konzentrierter Salzsäure hydrolysiert wurde. Die Ausbeute war hier etwa 90%.

Variante b)

Nach Grauert /203/ lassen sich diese Verbindungen auch mit Methyljodid herstellen. Infolge der unvollständigen Beschreibung dieser Reaktion in der Literatur soll hier etwas ausführlicher die Synthese behandelt werden.

Es wurden 0,1 mol des entsprechenden Benzolamins in ca. 200 ml Diethylether unter Rühren und Eiskühlung mit einem Überschuß von Essigsäureanhydrid in Portionen versetzt bis keine heftige Reaktion mehr zu erkennen war. Es fielen weiße Kristalle aus. Im Falle des 3-Methyl-anilins wurde das Lösungsmittel abdestilliert und der ölige Rückstand auf Eis gegeben, wo weiße Kristalle nach Anreiben ausfielen. Es wurde aus Ethanol umkristallisiert.

Nr.	Fp.	Fp. /Lit./	Ausbeute	Summenformel	Molmasse
<u>2b</u>	65°	65,5°/206/	86%	C ₉ H ₁₁ NO	149,2
<u>2c</u>	149°	151° /207/	96%	C ₉ H ₁₁ NO	149,2
<u>2d</u>	139°	140° /208/	60%	C ₁₀ H ₁₃ NO	163,2

Nun wurde 0,1 mol des acetylierten Benzolamins in 100 ml absolutem Aceton zum Sieden gebracht und mit 0,1 mol KOH (Pastillen) und derselben Menge Methyljodid in 30 ml Aceton versetzt. Nach einiger Zeit des Rückflußkochens setzte sich langsam ein weißer Niederschlag von KI ab. Im Dünnschichtchromatogramm (CHCl₃/Ethanol 3 : 1) konnte man den Fortgang

der Reaktion bis zu ihrem Ende verfolgen, nachdem man innerhalb von 7 bis 8 Stunden noch mehrmals ein Äquivalent KOH und Methyljodid zugegeben hat. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung filtriert, eingeeengt und mit 200 ml Wasser versetzt. Mit 3 x 50 ml Diethylether wurde das Produkt aus der wäßrigen Phase extrahiert. Nach Trocknen der etherischen Phase wurde eingeeengt, mit Petrolether versetzt und längere Zeit kühl gestellt. Es kristallisierte das methylierte Produkt in rhombischen Kristallen aus, die durch nochmaliges Umkristallisieren mit Ether/Petrolether weiter gereinigt werden konnten.

Nr.	Fp.	Fp. /Lit./	Ausbeute	Summenformel	Molmasse
<u>3b</u>	65°	66° /209/	83%	C ₁₀ H ₁₃ NO	163,2
<u>3c</u>	82°	83° /210/	80%	C ₁₀ H ₁₃ NO	163,2
<u>3d</u> ^A			40%	C ₁₁ H ₁₅ NO	177,3

^A wurde sofort weiterverarbeitet

Das Produkt wurde zwei Stunden auf dem Wasserbad in einer Mischung aus 18g KOH, 13g Wasser und 37 ml Methanol und nach Zugabe von 50 ml Wasser weitere zwei Stunden gekocht. Aus der abgekühlten Reaktionsmischung wurde das hydrolisierte Produkt mit Ether extrahiert. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels verbleibt ein Öl, das im Vakuum nochmals destilliert wurde.

Nr.	Kp. (Druck)	Kp./Lit./	Ausbeute	Summenformel	Molmasse
<u>4b</u>	78°(6,2 mbar)	207°/209/	73%	C ₈ H ₁₁ N	121,2
<u>4c</u>	70°(1,8 mbar)	211°/211/	78%	C ₈ H ₁₁ N	121,2
<u>4d</u> ^A			63%	C ₉ H ₁₃ N	135,2

^A wurde sofort weiterverarbeitet

N-Methyl-barbitursäure:

Nach der Vorschrift zur Darstellung von Barbitursäuren /204/ wurde N-Methylharnstoff mit Malonsäurediethylester in Ethanol mit Natriumethanolat gekocht und die isolierte N-Methylbarbitursäure aus Methanol umkristallisiert.

Fp.: 132° C; Ausbeute: 83%

3-Methyl-6-chloruracil:

Nach Pfeleiderer /205/ wurde die N-Methylbarbitursäure mit POCl_3 und 4% Wasser umgesetzt und das Produkt mehrfach mit Aktivkohle aus Wasser und Ethanol umkristallisiert.

Fp.: 276° C; Ausbeute: 79%

6-Anilino-uracile (5):

3-Methylchloruracil und das entsprechende Anilin wurden zusammen im Verhältnis 1 : 2 auf 150° bis 160° C erhitzt /203/, bis das im Anilin unlösliche Chloruracil abreagiert war. Die nun klare Lösung wurde abgekühlt und mit Ether versetzt, so daß das Anilinouracil auskristallisierte. Dieses konnte aus Ethanol und n-Butanol unter Zusatz von Aktivkohle umkristallisiert werden. Als Nebenprodukt trat durch Weiterreaktion des Anilinouracils das entsprechende Deazaflavin auf, was sehr gut im Dünnschichtchromatogramm nachgewiesen werden konnte. Die Menge des Deazaflavins konnte durch Abbrechen der Reaktion sofort nach Aufklärung der vorher trüben Lösung auf ein Minimum reduziert werden.

Nr.	Fp.(°C)	Ausbeute	Summenformel	Molm.	Analyse (%)		
					Ber. C Gef. C	Ber. H Gef. H	Ber. N Gef. N
<u>5b</u>	259-261	68%	$C_{12}H_{13}N_3O_2$	231,3	62,33 62,40	5,67 5,71	18,17 18,14
<u>5c</u>	290-293	70%	$C_{12}H_{13}N_3O_2$	231,3	62,33 62,38	5,67 5,69	18,17 18,17
<u>5d</u>	275-277	66%	$C_{13}H_{15}N_3O_2$	245,3	63,66 63,83	6,16 6,17	17,13 17,09
<u>5g</u>	186-187	69%	$C_{13}H_{15}N_3O_2$	245,3	63,66 63,65	6,16 6,13	17,13 17,32
<u>5h</u>	238-240	65%	$C_{13}H_{15}N_3O_2$	245,3	63,66 64,04	6,16 6,16	17,13 17,21
<u>5i</u>	183-184	55%	$C_{14}H_{17}N_3O_2$	259,3	64,85 64,45	6,61 6,62	16,21 16,04

Alloxazine (6) und Isoalloxazine (7):

0,01 mol des entsprechenden Anilinouracils in 20 ml Eisessig wurden mit 3,5 g $NaNO_2$ versetzt und 2 bis 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt /103,104/. Nach Zugabe von 50 ml Wasser wurde weitere 2 bis 3 Stunden stehengelassen. Die ausgefallenen Kristalle wurden abgesaugt und mit Wasser gewaschen. Das entstandene N-Oxid des Flavins wurde sofort in 10 ml Wasser mit 5,2 g Natriumdithionit für 2 bis 3 Stunden gerührt und anschließend mit Sauerstoff zur Reoxidation von Überreduzierten Anteilen gespült. Nach Absaugen des Endproduktes wurde aus Essigsäure umkristallisiert oder durch Säulenchromatographie gereinigt.

3-H-Lumiflavin wurde nach der Literaturvorschrift von Hemmerich et al /202/ durch Kopplung des N-Methyl-anilins mit p-Aminobenzoesäure zum Diazofarbstoff und Umsetzung mit Barbitursäure zum Lumiflavin dargestellt, da die 3-H-Anilino-uracile in den üblichen Lösungsmitteln nicht umgesetzt werden konnten.

In Position 3 alkylierte Isoalloxazine wurden durch Rühren der 3-H-Verbindung in DMF mit einem Überschuß des Alkylhalogenids (z. B. Deuteromethyliodid) in Gegenwart von Kaliumcarbonat dargestellt /106/. Das Endprodukt wurde aus Chloroform und iso-Propylether umkristallisiert.

Nr.	Fp. (°C)	Ausbeute	Summenformel	Molm.	Analyse (%)		
					Ber. C Gef. C	Ber. H Gef. H	Ber. N Gef. N
<u>6b</u>	299	63%	$C_{12}H_{10}N_4O_2$	242,2	59,50 59,51	4,16 4,24	23,13 23,21
<u>6c</u>	329	85%	$C_{12}H_{10}N_4O_2$	242,2	59,50 59,33	4,16 4,22	23,13 23,03
<u>6d</u>	295-298	82%	$C_{13}H_{12}N_4O_2$	256,3	60,93 61,00	4,72 4,70	21,86 22,01
<u>7b</u>	285-288	59%	$C_{13}H_{12}N_4O_2$	256,3	60,93 60,42	4,72 4,71	21,86 21,99
<u>7c</u>	281-284	80%	$C_{13}H_{12}N_4O_2$	256,3			
<u>7d</u>	313-315	90%	$C_{14}H_{14}N_4O_2$	270,3	62,21 61,39	5,22 5,14	20,73 20,75

Thiaisoalloxazine (10):

0,01 mol des entsprechenden Anilinouracils in Methylenchlorid wurden mit 1 ml Thionylchlorid versetzt und unter Stickstoff für vier Stunden gekocht /59/. Nach Abkühlen wurde Lösungsmittel und $SOCl_2$ im Vakuum abdestilliert. Das sauerstoffempfindliche Zwischenprodukt wurde in Methylenchlorid mit 1 ml Thiophenol für weitere 2 bis 4 Stunden gekocht. Von der abgekühlten Lösung wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand mit Ether gewaschen. Die Kristalle wurden abgesaugt und aus Ethanol oder Eisessig umkristallisiert.

Nr.	Fp. (°C)	Ausb.	Summenformel	Molm.	Analyse (%)			
					Ber. C Gef. C	Ber. H Gef. H	Ber. N Gef. N	Ber. S Gef. S
<u>10b</u>	308-310	89%	$C_{13}H_{13}N_3O_2S$	275,3	56,71 56,51	4,76 4,77	15,26 15,02	11,08 10,84
<u>10c</u>	298	51%	$C_{13}H_{13}N_3O_2S$	275,3				
<u>10d</u>	320-325	92%	$C_{14}H_{15}N_3O_2S$	289,4	58,12 57,91	5,23 5,21	14,52 14,65	

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mehrfachresonanz-Techniken ENDOR und TRIPLE auf das biologisch interessante Enzymsystem der Flavine anzuwenden. Um die optimalen Meßbedingungen dieser Untersuchungsmethoden für die paramagnetischen Spezies zu finden, war es erforderlich, zuerst Experimente an einigen Modellradikalen durchzuführen. Dazu wurden verschiedene Alloxazine, Isoalloxazine und Thiaisoalloxazine synthetisiert, die sich durch die Stellung von Methylsubstituenten unterscheiden oder bei denen Protonen selektiv durch Deuteriumkerne ersetzt wurden. Diese Modellverbindungen einiger redoxaktiver Flavoenzyme wurden durch NMR- und Massenspektren sowie durch die Elementaranalysen charakterisiert.

Die verschiedene Substitution der Verbindungen ließ die Zuordnung von NMR-Signalen zu den Protonen bestimmter Molekülpositionen zu. Man kann, wie auch aus der Literatur bekannt ist, unterschiedlich starke Abhängigkeiten der chemischen Verschiebungen der einzelnen Protonen feststellen.

Mit Hilfe der Massenspektroskopie der Grundverbindungen und diverser ^2H -, ^{13}C - und ^{15}N -markierter Verbindungen konnte der unimolekulare Abbau im Spektrometer von Alloxazinen, Isoalloxazinen und Thiaisoalloxazinen verfolgt werden. Weiterhin wurden Fragmentierungswege eines Deazaflavins vorgeschlagen, wobei deutliche Unterschiede zwischen diesen Verbindungen zu beobachten sind. So ist die Stabilität der Bindung einer Methylgruppe zum Stickstoff in Position 10 des Grundgerüsts sehr stark abhängig vom Heteroatom in Position 5. Bei den Isoalloxazinen erfolgt bevorzugt eine Abspaltung dieser Methylgruppe im Massenspektrometer. Bei den Thiaisoalloxazinen wird nur aus dem Molekülion und den Fragmentionen, die das Schwefelatom noch enthalten, dieser Substituent eliminiert. Die Fragmentionen, die durch Fragmentierung eines Schwefelkernes entstanden sind, weisen keine derartige Dealkylierung auf. Für Deazaflavine konnte eine bevorzugte Abspaltung dieser Methylgruppe überhaupt nicht nachgewiesen werden. Weiterhin konnte belegt werden, daß beim Abbau des Pyrimidinteils der Isoalloxazine zuerst die

Carbonylgruppe der Position 4 eliminiert wird. Damit konnte für die Isoalloxazine und Alloxazine die Aussage der Literatur widerlegt werden, daß bei ihnen eine Aufweitung des Benzolringes zur Stabilisierung von Fragmentionen führt. Außerdem kann die Annahme, daß nach einer Decarbonylierung des Moleküls ein offenkettiges Fragmention gebildet wird, nicht richtig sein.

Für alle zur Verfügung stehenden Verbindungen wurden Erzeugungsmethoden für die Anion- Kation- und Neutralradikale gesucht. Von den Alloxazinen und Thiaalloxazinen konnten nur die Kationradikale dargestellt werden. Anionradikale der Thiaisoalloxazine konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Von den erzeugten paramagnetischen Stufen wurden erstmals die EPR-, ENDOR- und TRIPLE-Spektren in isotropen flüssigen Lösungen registriert. Selbst die Radikale der freien Coenzyme Riboflavin, Thiariboflavin, FMN und FAD ergaben Spektren mit guter Auflösung. So konnten sämtliche Protonenkopplungen größer als 0,5 MHz und Stickstoffkopplungen größer als 1 MHz, sowie teilweise Kopplungen von Deuterium- und ^{13}C -Kernen bei entsprechend markierten Verbindungen bestimmt werden. Durch Vergleich der Meßergebnisse der unterschiedlich substituierten und deuterierten Radikale unter Berücksichtigung der verschiedenen gyromagnetischen Verhältnisse der Kerne und der Aussagen der Spindichte-Transfer-Theorien konnten die gemessenen Kopplungskonstanten den Molekülpositionen zugeordnet werden. Die Ergebnisse wurden durch Simulationen der EPR-Spektren mit den Kopplungen aus den ENDOR-Untersuchungen überprüft. Dabei ergaben sich im Gegensatz zu EPR-Literaturangaben meßbare Spindichten im Pyrimidinteil der Verbindungen sowie eine ungewöhnlich große Kopplung für die Protonen in Position 7 des Thiaflavin-Radikals, während im Falle der Kationradikale keine Kopplung für die Position 9 gemessen werden konnte. Unterschiede der Hyperfeinkopplungskonstanten der verschiedenen protonierten Radikale konnten aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse wurden unter Berücksichtigung von Meßwerten der Kationradikale einiger Heterocyclen wie Phenothiazin und Phenazin diskutiert.

Im Falle der Coenzyme Riboflavin, Thiariboflavin, FMN und FAD konnte die Vorzugskonformation des großen Substituenten

in Position 10 bezogen auf das Isoalloxazin-Gerüst festgestellt werden. Die beiden Methylenprotonen sind nahezu äquivalent. Ihre Bindungsachsen zum benachbarten Kohlenstoffatom stehen in einem Winkel von etwa 60° zum p_z -Orbital des Stickstoffatoms in Position 10. Die Hydroxyalkylkette ist somit senkrecht zum Isoalloxazin-Gerüst ausgerichtet. Beim Tetraacetyl-Riboflavin-Radikal konnte eine geringe Verdrehung des Substituenten gegenüber der Konformation des Riboflavin-Radikals festgestellt werden. Für den 3-Dimethylamino-propyl-Rest in Position 10 des Promazin-Kationradikals wurden Verhältnisse wie beim Riboflavin-Radikal gefunden.

Von fast allen Verbindungen konnten außerdem die EPR- und ENDOR-Spektren der paramagnetischen Stufen in gefrorenen Lösungen registriert werden. In den Doppelresonanz-Spektren traten Matrixsignale und Methylprotonensignale mit großen Intensitäten auf, sowie kleinere Resonanzlinien für die Kopplung des 6α -Protons, das eine nur geringe HFS-Anisotropie besitzen muß. Die Matrixsignale für Protonen, Deuteronen und Fluorkerne in den entsprechenden Lösungsmitteln zeigen die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons mit den magnetisch aktiven Kernen der Matrix in einem Radius von 0,8 nm um das paramagnetische Zentrum an. Da in perdeutერიerten Lösungsmitteln auch ein Protonensignal zu beobachten war, kann auf eine Wechselwirkung der Radikale mit diamagnetischen Ausgangsmolekülen in der Lösung geschlossen werden. Die Intensitäten dieser Matrixlinien in unterschiedlichen Lösungsmitteln lassen es zu, die Stärke dieser rein dipolaren Beziehungen qualitativ abzuschätzen. So zeigen ionische Radikale in polaren Lösungsmitteln stärkere Wechselwirkungen mit Matrixmolekülen als Neutralradikale in unpolaren Lösungsmitteln.

Die Methylsignale in den ENDOR-Spektren sind aufgespalten, was sich durch unterschiedlich orientierte Moleküle in den gefrorenen Lösungen erklären läßt. Somit konnten unter der Annahme eines rotationssymmetrischen HFS-Tensors die z - und xy -Komponenten $A_\perp$ und $A_\parallel$ bestimmt werden. Da dies für alle Methylprotonen in den Verbindungen zutraf, kann von einem fast planaren Radikal ausgegangen werden. Einzig bei 5-Methyl-

Flavinradikalen müssen andere sterische Verhältnisse angenommen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse ließen sich auch Kopplungen bestimmten Molekülpositionen zuordnen und somit die Aussagen der ENDOR-Untersuchungen an den flüssigen Lösungen bestätigen.

Die Messungen von vier Enzymen mit radikalischen Flavin-Coenzym-Zentren in gefrorenen wäßrigen Lösungen ergaben ebenfalls ENDOR-Spektren mit guten Signal-Rausch-Verhältnissen. Anhand der verschiedenen 8-Methyl-Kopplungen konnte auf den Protonierungszustand der Coenzyme geschlossen werden. Die intensiven Matrixsignale und breiten Methylprotonensignale der Radikale von Flavodoxinen und der NADPH-Dehydrogenase deuten auf starke Wechselwirkungen zwischen den paramagnetischen Zentren und den Wassermolekülen bzw. den Proteinen und eine geringe Beweglichkeit der Flavinradikale in der "Protein-Tasche" aufgrund dieser starken Komplexierung in diesen Enzymen hin. Im Falle der Methanol-Oxidase kann eine große Beweglichkeit und geringe Komplexierung des Coenzym-Radikals angenommen werden, da intensitätsschwache Matrixsignale und schmale Methylsignale registriert wurden.

Die Stabilität der blauen Flavodoxin-Radikale kann mit Wasserstoffbrückenbindungen der Proteine zu den Positionen 4, 4a und 5 des Isoalloxazin-Gerüsts, also einer Blockierung dieser Positionen wie beim 5-Methyl-Flavin-Neutralradikal, erklärt werden. Rote Radikale (z. B. der Dehydrogenasen) sind dort nicht komplexiert und können wie von Hemmerich vorgeschlagen über die Positionen 4a und 5 weiterreagieren. Sie sind deshalb in natura nicht existent.

Im Falle der Methanol-Oxidase konnte außerdem nachgewiesen werden, daß im Enzym nach Zugabe eines Pseudosubstrates eine zweite Spezies von Flavinradikalen entsteht. Die Frage, ob unterschiedlich reaktive Zentren in den Enzymen vorliegen oder ob Hydroxylamin die Umgebung der Isoalloxazine ändert, muß durch weitere Experimente geklärt werden.

Es kann somit abschließend festgestellt werden, daß im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch ENDOR-Untersuchungen von flüssigen Radikallösungen von Flavinmodellverbindungen die

Spindichte-Verteilung weitgehend aufgeklärt werden konnte. Außerdem ließen die ENDOR-Untersuchungen der gefrorenen Lösungen von Flavin- und Flavoenzymradikalen Aussagen über die Struktur der paramagnetischen Spezies sowie über deren Wechselwirkungen mit der Umgebung zu.

7. Ausblick

Nachdem derart komplexe, biologisch relevante Radikale in flüssigen und gefrorenen Lösungen mit der EPR- und der ENDOR-Spektroskopie untersucht werden konnten, wird der nächste Schritt der Austausch der "ENDOR-freundlichen" organischen Lösungsmittel gegen das physiologische Medium Wasser sein. Dies ist bekanntlich mit einigen Schwierigkeiten verbunden, ist doch erst ein Fall von ENDOR-in-Lösung an Radikalen in Wasser bekannt /5/. Es könnte dann aber möglich sein, Flavoenzym-Radikale unter hochauflösenden Bedingungen zu spektroskopieren und die entsprechenden Kopplungskonstanten von Protonen und Stickstoffatomen zu bestimmen und Wechselwirkungen des Flavins mit der Proteinhülle festzustellen. Man würde weitere Erkenntnisse über Konformationen der nativen Flavine, Art der Protein-Flavin-Bindungen und Art der Enzym-Substrat-Wechselwirkungen sammeln und im weiteren Informationen über den radikalischen Mechanismus einiger durch Flavoenzyme katalysierten Redoxreaktionen gewinnen können. Inwieweit die paramagnetische Resonanzspektroskopie bei der Untersuchung von intakten lebenden Zellen, Organellen und Lebewesen eingesetzt werden kann, ist noch nicht abzusehen.

Fragestellungen, die im Rahmen dieser Arbeit für weitere Experimente aufgetaucht sind, beziehen sich meist auf heteroatomsubstituierte Flavine, die man durch Einfügen z. B. von Sauerstoff oder anderen Atomen in das Grundgerüst erhalten würde. Interessant ist sicherlich der Einfluß dieser Heteroatome auf die Eigenschaften dieser Moleküle. Außerdem ist die Untersuchung der Thia- und Deazaflavine noch nicht abgeschlossen, da man bei ersteren die Spindichte am Schwefelatom noch nicht gemessen hat und bei letzteren noch keine stabilen Radikale kennt.

Im Übrigen dürfte die elektrochemische Darstellungsmethode der Radikale gerade bei solch komplizierten paramagnetischen Verbindungen enorme Vorteile gegenüber den üblichen chemischen haben und sollte in Zukunft für die EPR- und ENDOR-Experimente an diesen und ähnlichen Radikalen stärker eingesetzt werden.

8. Anhang

8.1. Verwendete Symbole und Konstanten

Allgemeine und magnetische Konstanten

g_e	g-Faktor des freien Elektrons
g_K	g-Faktor des Kernes
$\hbar$	Plancksche Konstante, $\hbar = h/2\pi$
k	Boltzmannkonstante
μ_B	Bohrsches Magneton
μ_K	Kern-Magneton

Wechselwirkungskonstanten und Tensoren

a_x	isotrope HFSC des Kernes x
$\hat{A}$	HFS-Tensor
$\hat{A}'$	anisotroper HFS-Tensor mit Elementen $A'_{ij} = A_{ij} - a$
$A_{\parallel}, A_{\perp}$	Komponenten des HFS-Tensors parallel bzw. senkrecht zur z-Achse
B	Spin-Rotations-Parameter
g	isotroper g-Faktor
$\hat{Q}'$	Quadrupoltensor
$\text{Tr} [A'^2]$	Spur des quadrierten HFS-Tensors

Operatoren und Quantenzahlen

$\hat{H}$	Spin-Hamiltonoperator
$\hat{H}(t)$	Zeitabhängiger Spin-Hamiltonoperator
m_S, m_I	magnetische Elektronen- bzw. Kernspinquantenzahlen
M_S, M_I	magnetische Gesamtspinquantenzahlen
$\hat{S}, \hat{I}$	Elektronen- bzw. Kernspinoperatoren

Felder und Frequenzen

B_0	statisches Magnetfeld
B_e	Amplitude des Mikrowellenfeldes
B_n	Amplitude des NMR- bzw. RF-Feldes
ν_{ENDOR}	Frequenzen der ENDOR-Linien im Spektrum
ν_{EPR}	Resonanzfrequenz eines EPR-Überganges
ν_N	freie Kernfrequenz des Kernes N

ν_{NMR} Resonanzfrequenz eines NMR-Überganges

Relaxationsparameter

δ_e, δ_n induzierte Elektronen- bzw. Kernspin-Übergangsraten
 τ_R Rotations-Korrelations-Zeit
 ω_e Elektronenspin-Gitter-Relaxationsraten
 ω_n Kernspin-Gitter-Relaxationsraten
 ω_x Kreuzrelaxationsraten

Weitere Symbole

a Konzentration bzw. Aktivität
 E Potential
 E_a, E_k Potential für anodische Oxidation bzw. kathodische Reduktion
 E_o Standardpotential
 F Faraday-Konstante
 n Anzahl der Mole
 m/z Massen-Ladungs-Verhältnis
 T absolute Temperatur
 Y Signalamplitude
 z Anzahl von übertragenen Elektronen pro Molekül
 chemische Verschiebung
 $\varrho(I)$ Spindichte am Kernort I
 δ Sättigungsparameter
 θ Winkel zwischen einer CH_3 -Bindung und der Achse eines p_z -Orbital am benachbarten Atom

8.2. Abkürzungen

ADP Adenosin-Diphosphat
 ATP Adenosin-Triphosphat
 DMF Dimethylformamid
 DMSO Dimethylsulfoxid
 EDTA Ethylen-Diamin-Tetra-Acetic-Acid
 ENDOR Electron Nuclear Double Resonance
 EPR Electron-Paramagnetic-Resonance
 EIE ENDOR-induced EPR
 FAD Flavin-Adenin-Dinukleotid

FMN	Flavin-Mononukleotid
FP	Flavoprotein
HFS	Hyperfeinstruktur
HFSC	Hyperfeinkopplungskonstante
HMPA	Hexamethylphosphorsäuretriamid
MW	Mikrowelle
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OYE	Old Yellow Enzyme (NADPH-Dehydrogenase)
RF	Radiofrequenz
TARF	Tetraacetyl-Riboflavin
TBA ⁺ BF ₄ ⁻	Tetrabutylammonium-Tetrafluoroborat
TMS	Tetramethylsilan
TRIPLE	Electron-Nuclear-TRIPLE-Resonance

8.3. Maßsystem

In der vorliegenden Arbeit wurde in der Regel das SI-Einheitensystem verwendet. Die Einheit der magnetischen Induktion B ist in diesem System das Tesla (T).

Die Meßwerte der Kopplungsparameter wurden stets in MHz angegeben. Diese Einheit ergibt sich bei den ENDOR-Messungen unmittelbar. Sie ist zweckmäßiger als die Magnetfeldeinheit, die strenggenommen nur bei gleichzeitiger Angabe des g -Faktors sinnvoll ist:

$$a[\text{Hz}] = \frac{g \mu_B}{h} a[\text{T}]$$

So ergibt sich unter Verwendung des g -Faktors des freien Elektrons die Umrechnung

$$0,1 \text{ mT} \approx 2,8025 \text{ MHz} \quad (g = 2,002319).$$

9. Literaturverzeichnis

- / 1/ L. J. Berliner, J. Reuben, eds., "Biological Magnetic Resonance Bd. 1 - 3", Plenum Press, New York 1978
- / 2/ A. M. Gronenborn, K. Roth, Chemie in unserer Zeit 1982, 16, 35
- / 3/ K. Roth, A. M. Gronenborn, Chemie in unserer Zeit 1982 16, 1
- / 4/ A. Oppelt, Physik in unserer Zeit 1983, 14, 7
- / 5/ F. Lendzian, W. Lubitz, H. Scheer, C. Bubenzer, K. Möbius, J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 4635
- / 6/ A. L. Lehninger, "Biochemie", Verlag Chemie, Weinheim 1979
- / 7/ J. D. Rawn, "Biochemistry", Harper & Row, New York 1983
- / 8/ H. W. Heldt, Angew. Chem. 1972, 84, 792
- / 9/ P. Hemmerich, C. Veege, H. C. S. Wood, Angew. Chem. 1965, 77, 699
- /10/ P. Hemmerich, G. Nagelschneider, C. Veege, FEBS Lett. 1970, 8, 69
- /11/ C. J. Gray, "Enzym-katalysierte Reaktionen", Fischer-Verlag, Stuttgart 1976, Kapitel 3
- /12/ C. Walsh, "Enzymatic Reaction Mechanisms", Freeman and Comp., San Francisco 1979, Section III
- /13/ C. Walsh, Acc. Chem. Res. 1980, 13, 148
- /14/ F. Müller in "Topics in Current Chemistry" ed. F. L. Boschke, Springer-Verlag, Berlin 1983, 108, 72
- /15/ P. Hemmerich in "Fortschritte der Chemie org. Naturstoffe", Springer-Verlag, Berlin 1976, 33, 451
- /16/ J. Koziol, A. Koziolow, J. Konarski, D. Panek-Janc, J. Dawidowski, in "Flavins and Flavoproteins", ed. K. Yagi, T. Yamano, Japan Scient. Soc. Press 1980, 475
- /17/ K. H. Dudley, P. Hemmerich, Helv. Chim. Acta 1967, 50, 355

- /18/ Y. Kyogoku, K. Kawano, N. Ohishi, A. T. Suzuki, K. Yagi, in "Flavins and Flavoproteins" ed. K. Yagi, T. Yamano, Japan Scient. Soc. Press 1980, 485
- /19/ L. Michaelis, M. P. Schubert, C. V. Smythe, J. Biol. Chem. 1936, 116, 587
- /20/ L. Michaelis, G. H. Schwarzenbach, J. Biol. Chem. 1938, 123, 527
- /21/ H. Beinert, J. Am. Chem. Soc. 1956, 78, 5323
- /22/ V. Massey, G. Palmer, Biochem. 1966, 5, 3181
- /23/ R. C. Bray, M. J. Barber, M. P. Coughlan, H. Dalton, E. M. Fielden, D. J. Lowe, in "Flavins and Flavoproteins", ed. T. P. Singer, Elsevier Scient. Publ. Comp., Amsterdam 1976, 553
- /24/ G. Palmer, F. Müller, V. Massey, in "Flavins and Flavoproteins", ed. H. Kamin, Baltimore 1971, 123
- /25/ D. E. Edmondson, G. Tollin, in "Topics in Current Chemistry", ed. F. L. Boschke, Springer-Verlag, Berlin 1983, 108, 111
- /26/ F. Müller, H. J. Grande, L. J. Harding, W. R. Dunham, A. J. W. G. Visser, J. H. Reinders, P. Hemmerich, A. Ehrenberg, Eur. J. Biochem. 1981, 116, 17
- /27/ L. Kevan, L. D. Kispert, "Electron Spin Double Resonance Spectroscopy", John Wiley and Sons, New York 1976
- /28/ K. Möbius, R. Biehl in "Multiple Electron Resonance Spectroscopy", eds. M. M. Dorio, J. H. Freed, Plenum Press, New York 1979, 475
- /29/ K. P. Dinse, R. Biehl, K. Möbius, J. Chem. Phys. 1974, 61, 4335
- /30/ J. Westerling, H. I. X. Mager, W. Berends, Tetrahedron 1975, 31, 437
- /31/ F. Müller, P. Hemmerich, A. Ehrenberg, G. Palmer, V. Massey, Eur. J. Biochem. 1970, 14, 185
- /32/ A. Ehrenberg, F. Müller, P. Hemmerich, Eur. J. Biochem. 1967, 2, 286

- /33/ J. R. Norris, H. L. Crespi, Chem. Phys. Lett. 1972, 16, 542
- /34/ W. H. Walker, A. Ehrenberg, FEBS Lett. 1969, 3, 315
- /35/ F. Müller, P. Hemmerich, A. Ehrenberg, in "Flavins and Flavoproteins", ed. H. Kamin, Baltimore 1971, 107
- /36/ A. Ehrenberg, G. Eriksson, P. Hemmerich, in "Intern. Kongr. U. Oxidasen u. Rel. Systeme" 1964, 179
- /37/ L. E. G. Eriksson, A. Ehrenberg, Acta Chem. Scand. 1964, 18, 1437
- /38/ A. Ehrenberg, Arkiv f. Kemi 1962, 19, 97
- /39/ a) L. E. G. Eriksson, A. Ehrenberg, Arch. Biochem. Biophys. 1965, 110, 628
b) A. Ehrenberg, L. E. G. Eriksson, Arch. Biochem. Biophys. 1964, 105, 453
- /40/ a) A. V. Guzzo, G. Tollin, Arch. Biochem. Biophys. 1963, 103, 231
b) A. V. Guzzo, G. Tollin, Arch. Biochem. Biophys. 1964, 105, 380
- /41/ J. Fritz, F. Müller, S. G. Mayhew, Helv. Chim. Acta 1973, 56, 2250
- /42/ L. E. G. Eriksson, A. Ehrenberg, J. S. Hyde, Eur. J. Biochem. 1970, 17, 539
- /43/ L. E. G. Eriksson, A. Ehrenberg, Biochim. Biophys. Acta 1973, 293, 57
- /44/ L. E. G. Eriksson, J. S. Hyde, A. Ehrenberg, Biochim. Biophys. Acta 1969, 192, 211
- /45/ L. E. G. Eriksson, J. S. Hyde, A. Ehrenberg, Biochim. Biophys. Acta 1968, 167, 482
- /46/ L. E. G. Eriksson, W. W. Walker, Acta Chem. Scand. 1970, 24, 3779
- /47/ J. Salach, W. H. Walker, T. P. Singer, A. Ehrenberg, P. Hemmerich, S. Ghisla, U. Hartmann, Eur. J. Biochem. 1972, 26, 267

- /48/ W. H. Walker, J. Salach, M. Gutman, T. P. Singer, J. S. Hyde, A. Ehrenberg, FEBS Lett. 1969, 5, 237
- /49/ A. Ehrenberg, L. E. G. Eriksson, J. S. Hyde, in "Flavins and Flavoproteins", ed. H. Kamin, Baltimore 1971, 141
- /50/ H. J. Fey, H. Kurreck, W. Lubitz, Tetrahedron 1979, 35, 905
- /51/ M. Bock, W. Lubitz, H. Kurreck, H. Fenner, R. Grauert, J. Am. Chem. Soc. 1981, 103, 5567
- /52/ H. Kurreck, M. Bock, N. Bretz, M. Elsner, H. Kraus, W. Lubitz, F. Müller, J. Geissler, P. M. H. Kroneck, J. Am. Chem. Soc., in press
- /53/ L. Kevan, in "Electron Spin Double Resonance Spectroscopy", eds. L. Kevan, L. D. Kispert, John Wiley and Sons, New York 1976, 165
- /54/ W. H. Walker, T. P. Singer, S. Ghisla, P. Hemmerich, Eur. J. Biochem. 1972, 26, 279
- /55/ S. Ghisla, W. C. Kenney, W. R. Knappe, W. McIntire, T. P. Singer, Biochem. 1980, 19, 2537
- /56/ T. P. Singer, D. E. Edmondson, in "Methods in Enzymology" Academic Press 1980, 66, 253
- /57/ H. Fenner, R. W. Grauert, P. Hemmerich, Liebigs Ann. Chem. 1978, 193
- /58/ H. Fenner, R. Grauert, P. Hemmerich, H. Michel, V. Massey, Eur. J. Biochem. 1979, 95, 183
- /59/ H. Fenner, R. W. Grauert, L. Tessendorf, Arch. Pharm. 1981, 314, 874
- /60/ H.-J. Duchstein, H. Fenner, P. Hemmerich, in "Flavins and Flavoproteins", eds. K. Yagi, T. Yamano, Japan Scient. Soc. Press 1980, 23
- /61/ C. Walsh, J. Fisher, F. Jacobson, R. Spencer, W. Ashton, R. Brown, in "Flavins and Flavoproteins", eds. K. Yagi, T. Yamano, Japan Scient. Soc. Press 1980, 13
- /62/ P. Hemmerich, V. Massey, H. Fenner, FEBS Lett. 1977, 84, 5

- /63/ H. Fenner, H. H. Rössler, H.-J. Duchstein, P. Hemmerich,
in "Flavins and Flavoproteins", ed. T. P. Singer, Elsevier
Scient. Publ. Comp. Amsterdam 1976, 343
- /64/ K. Scheffler, H. B. Stegmann, "Elektronenspinresonanz",
Springer-Verlag, Berlin 1970
- /65/ N. M. Atherton, "Electron Spin Resonance", Ellis Horwood
Limited, Chichester 1973
- /66/ M. M. Dorio, H. H. Freed, eds. "Multiple Electron Reso-
nance Spectroscopy", Plenum Press, New York 1979
- /67/ D. T. Wilkinson, H. R. Crane, Phys. Rev. 1963, 130, 852
- /68/ M. Plato, W. Lubitz, K. Möbius, J. Phys. Chem. 1981,
85, 1202
- /69/ K. Möbius, M. Plato, W. Lubitz, Phys. Rept. Vol. 87,
Nr. 4, 1982, 171
- /70/ H. H. Freed in "Multiple Electron Resonance Spectroscopy",
eds. M. M. Dorio, H. H. Freed, Plenum Press, New York
1979, 73
- /71/ J. S. Hyde, J. Chem. Phys. 1965, 43, 1806
- /72/ a) K.-P. Dinse, R. Biehl, K. Möbius, H. Haustein, Chem.
Phys. Lett. 1971, 12, 399
b) B. Kirste, H. Kurreck, Appl. Spectroscopy 1980, 34, 305
- /73/ L. Kevan in "Multiple Electron Resonance Spectroscopy",
eds. M. M. Dorio, H. H. Freed, Plenum Press, New York
1979, 229
- /74/ A. Carrington, A. D. McLachlan, "Introduction to Magnetic
Resonance", Chapman and Hall, London 1979
- /75/ A. Colligiani, C. Pinzino, A. L. Memerio, M. Brustolon,
C. Corvaja, J. Magn. Res. 1980, 39, 55
- /76/ J. S. Hyde, G. H. Rist, L. E. G. Eriksson, J. Phys.
Chem. 1968, 72, 4269
- /77/ A. Horsfield, J. R. Morton, D. H. Whiffen, Mol. Phys.
1961, 4, 425; 1962, 5, 115

- /78/ P. A. Narayana, M. K. Bowman, D. Becker, L. Kevan,
J. Chem. Phys. 1977, 67, 1990
- /79/ S. I. Weissman, J. Chem. Phys. 1956, 25, 890
- /80/ H. M. McConnell, J. Chem. Phys. 1956, 24, 633
- /81/ H. M. McConnell, D. B. Chesnut, J. Chem. Phys. 1957, 27,
984
- /82/ H. M. McConnell, H. H. Dearman, J. Chem. Phys. 1958,
28, 51
- /83/ H. M. McConnell, D. B. Chesnut, J. Chem. Phys. 1958,
28, 107
- /84/ H. C. Lefkowitz, J. Fain, F. A. Matsen, J. Chem. Phys.
1955, 23, 1690
- /85/ H. M. McConnell, J. Chem. Phys. 1958, 28, 1188
- /86/ H. M. McConnell, J. Chem. Phys. 1958, 29, 244
- /87/ R. Lefebvre, H. H. Dearman, H. M. McConnell, J. Chem.
Phys. 1960, 32, 176
- /88/ L. C. Snyder, T. Amos, J. Chem. Phys. 1965, 42, 3670
- /89/ A. D. McLachlan, Mol. Phys. 1960, 3, 233
- /90/ A. D. McLachlan, Mol. Phys. 1958, 1, 233
- /91/ H. C. Heller, H. M. McConnell, J. Chem. Phys. 1960, 32, 1535
- /92/ A. Horsfield, J. R. Morton, D. H. Whiffen, Mol. Phys.
1961, 4, 425
- /93/ G. A. Russell, J. J. McDonnell, P. R. Whittle, R. S. Givens,
R. G. Heske, J. Am. Chem. Soc. 1971, 93, 1452
- /94/ T. Kowamura, M. Hatsunaga, T. Q. Yonezawa, J. Am. Chem.
Soc. 1978, 100, 92
- /95/ D. Griller, E. C. Horswill, K. U. Ingold, Mol. Phys.
1974, 27, 1117
- /96/ W. Schlenk, E. Bergmann, Liebigs Ann. Chem. 1928, 463, 1
- /97/ O. Yokozawa, I. Miyashita, J. Chem. Phys. 1956, 25, 796

- / 98/ P. Sykes, "Reaktionsmechanismen d. Org. Chemie", Verlag Chemie, Weinheim 1979, 340
- / 99/ A. W. Blyth, J. Chem. Soc. 1879, 35, 530
- /100/ R. Kuhn, F. Weygand, Ber. 1934, 67, 1932
- /101/ M. Tischler, K. Pfister, R. D. Babson, K. Ladenburg, A. J. Fleming, J. Am. Chem. Soc. 1947, 69, 1487
- /102/ P. Rowan, V. Wood, Proc. Chem. Soc. 1963, 21; 1968, 452
- /103/ H. Goldner, G. Dietz, E. Carstens, Liebigs Ann. Chem. 1966, 694, 142
- /104/ F. Yoneda, Y. Sakuma, M. Ichiba, K. Shinomura, J. Am. Chem. Soc. 1976, 98, 830
- /105/ M. Janda, P. Hemmerich, Angew. Chemie 1976, 88, 475; Angew. Chemie Int. Ed. Engl. 1976, 15, 443
- /106/ P. Hemmerich, B. Prijs, H. Erlenmeyer, Helv. Chim. Acta 1960, 43, 372
- /107/ R. Grauert, Dissertation FU Berlin 1976
- /108/ J. Goldmann, franz. Patent Nr. 1.565.368, C. A. 72, 79067
- /109/ S. Ghisla, K. Hartmann, P. Hemmerich, F. Müller, Liebigs Ann. Chem. 1973, 1388
- /110/ G. A. Russell, R. Konaka, E. T. Strom, W. C. Danen, K.-Y. Chang, G. Kaupp, J. Am. Chem. Soc. 1968, 90, 4646
- /111/ G. Dryhurst, "Electrochemistry of Biological Molecules", Academic Press, New York 1971, 365
- /112/ R. Allendoerfer, private Mitteilung
- /113/ H. Fenner, Tett. Lett. 1970, 9, 617
- /114/ a) W. F. Forbes, P. D. Sullivan, J. Am. Chem. Soc. 1966, 88, 2862
 b) H. M. Buck, W. Bloemhoff, L. J. Vosterhoff, Tett. Lett. 1960, 9, 5
- /115/ M. Bock, Diplomarbeit FU Berlin 1980
- /116/ C. Jackson, N. K. D. Patel, Tett. Lett. 1967, 2255

- /117/ M. Elsner, Diplomarbeit FU Berlin 1981; beabsichtigte Dissertation
- /118/ H. J. Grande, C. G. van Schagen, T. Jarbadhan, F. Müller, *Helv. Chim. Acta* 1977, 60, 348
- /119/ P. Brown, C. C. Hornbeck, J. R. Cronin, *Org. Mass Spectr.* 1972, 6, 1383
- /120/ G. Spiteller, in "Adv. Heterocycl. Chem." eds. A. R. Katritzky, A. J. Boulton, Academic Press, New York, 1966, 7, 301
- /121/ L. Audier, A. Cambon, R. Guedj. M. Azzaro, *J. Het. Chem.* 1968, 5, 393
- /122/ M. Goldberg, I. Pecht, H. E. A. Kramer, R. Traber, P. Hemmerich, *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 673, 570
- /123/ A. Carrington, J. dos Santos-Veiga, *Mol. Phys.* 1962, 5, 21
- /124/ L. D. Tuk, D. W. Schiesser, *J. Phys. Chem.* 1962, 66, 937
- /125/ P. D. Sullivan, J. R. Bolton, *J. Magn. Res.* 1969, 1, 356
- /126/ B. L. Barton, G. K. Fraenkel, *J. Chem. Phys.* 1964, 41, 1455
- /127/ D. E. Kennedy, N. S. Dalal, C. A. McDowell, *Chem. Phys. Lett.* 1974, 29, 521
- /128/ M. F. Chiu, B. C. Gilbert, P. Hanson, *J. Chem. Soc. (B)*, 1970, 1700
- /129/ E. Schröder, C. Ruber, R. Schmiechen, "Arzneimittelchemie Bd. 1 - 3", Thieme Verlag, Stuttgart 1976, Bd. 1, 267
- /130/ . Swartz, . Bolton, . Borg, "Biological Applications of ESR", Wiley and Sons, New York 1972, 318
- /131/ H. Fenner, H. Möckel, *Tett. Lett.* 1969, 33, 2815
- /132/ F. L. Ruperez, J. C. Conesa, J. Soria, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* 1982, 1517
- /133/ W. H. Walker, A. Ehrenberg, J. M. Lhoste, *Biochim. Biophys. Acta* 1970, 215, 166
- /134/ V. Massey, F. Müller, R. Feldberg, M. Schuman, P. A. Sullivan, L. G. Howell, S. G. Mayhew, R. H. Matthews, *J. Biol.*

Chem. 1969, 244, 3999

- /135/ P. Hemmerich, A. Wessiak, in "Flavins and Flavoproteins",
ed. T. P. Singer, Elsevier, Amsterdam 1976,
- /136/ H. Kaim, J. D. Lambeth, L. M. Siegel, in "Flavins and
Flavoproteins", eds. K. Yagi, T. Yamano, Japan Scient.
Soc. Press 1980, 341
- /137/ S. G. Mayhew, Biochim. Biophys. Acta 1971, 235, 276
- /138/ M. L. Ludwig, R. Burnett, C. Doling, S. Jordan, S. Kendall,
W. Smith, in "Flavins and Flavoproteins", ed. T. P. Singer,
Elsevier, Amsterdam 1976, 393
- /139/ M. Tanaka, M. Haniu, K. T. Yasunobu, S. G. Mayhew, J.
Biol. Chem. 1974, 249, 4393
- /140/ D. E. Edmondson, G. Tollin, Biochem. 1971, 10, 113
- /141/ D. E. Edmondson, G. Tollin, Biochem. 1971, 10, 124
- /142/ J. W. Hinkson, W. A. Bulen, J. Biol. Chem. 1967, 242, 3345
- /143/ Y. J. Shetna, P. W. Wilson, R. E. Hansen, H. Beinert,
Proc. N. A. S. USA 1964, 52, 1263
- /144/ S. G. Mayhew, V. Massey, J. Biol. Chem. 1969, 244, 794
- /145/ H. Sahm, F. Wagner, Eur. J. Biochem. 1973, 36, 250
- /146/ N. Kato, Y. Omori, Y. Tani, K. Ogata, Eur. J. Biochem.
1976, 64, 341
- /147/ J. Geissler, P. Hemmerich, FEBS Lett. 1981, 126, 152
- /148/ H. Theorell, A. Akeson, Arch. Biochem. Biophys. 1956,
65, 439
- /149/ R. G. Matthews, V. Massey, J. Biol. Chem. 1969, 244, 1779
- /150/ A. G. Abramowich, V. Massey, J. Biol. Chem. 1976, 251, 5321
- /151/ S. G. Mayhew, V. Massey, Biochim. Biophys. Acta 1971, 235,
303
- /152/ H. H. Rössler, Dissertation FU Berlin, 1974
- /153/ E. O'Brien, L. T. Weinstock, C. Chang, J. Heterocycl.
Chem. 1970, 7, 99

- /154/ H. Fenner, P. Michaelis, Arch. Pharm. 1972, 305, 751
- /155/ L. D. Eirich, G. D. Vogels, R. S. Wolfe, Biochem. 1978, 17, 4583
- /156/ W. Ashton, D. Graham, R. Brown, E. Rogers, Tett. Lett. 1977, 2551
- /157/ K. H. Dudley, A. Ehrenberg, P. Hemmerich, F. Müller, Helv. Chim. Acta 1964, 47, 1354
- /158/ S. Konishi, S. Niizuma, H. Koizumi, Bull. Chem. Soc. Jap. 1970, 43, 3358
- /159/ S. Niizuma, M. Okuda, M. Koizumi, Bull. Chem. Soc. Jap. 1968, 41, 795
- /160/ H. G. Hoeve, W. A. Yeranov, Mol. Phys. 1967, 12, 597
- /161/ a) H.-J. Duchstein, H. Fenner, P. Hemmerich, W.-R. Knappe, Eur. J. Biochem. 1979, 95, 167
b) R. Grauert, private Mitteilung
- /162/ E. A. C. Lucken, Theoret. Chim. Acta 1963, 1, 397
- /163/ N. Helle, beabsichtigte Diplomarbeit FU Berlin
- /164/ J. Baudet, G. Berthier, B. Pullman, Compt. Rend. 1962, 254, 762
- /165/ M. Karplus, G. K. Fraenkel, J. Chem. Phys. 1961, 35, 1312
- /166/ J. P. Malrieu, B. Pullman, Theoret. Chim. Acta 1964, 2, 302
- /167/ R. J. Platenkamp, M. H. Palmer, A. J. W. G. Visser, in "Flavins and Flavoproteins" eds. K. Yagi, T. Yamano, Japan Scient. Soc. Press 1980, 45
- /168/ M. H. Palmer, I. Simpson, R. J. Platenkamp, J. Mol. Struct. 1980, 66, 243
- /169/ B. Grabe, Acta Chem. Scand. 1974, A28, 363
- /170/ M. F. Teitell, J. L. Fox, Int. J. Quant. Chem. 1982, 22, 583
- /171/ J. P. Colpa, E. de Boer, Mol. Phys. 1964, 7, 333
- /172/ N. Muller, R. S. Mulliken, J. Am. Chem. Soc. 1958, 80, 3489

- /173/ J. C. Winters, Dissertation Graduate College of Texas
A&M University 1979
- /174/ R. Kuhn, R. Ströbele, Ber. 1937, 70, 753
- /175/ V. Massey, G. Palmer, J. Biol. Chem. 1962, 237, 2347
- /176/ Q. H. Gibson, V. Massey, N. M. Atherton, Biochem. J.
1962, 85, 369
- /177/ N. D. Chasteen, J. Francavilla, J. Phys. Chem. 1976, 80,
867
- /178/ A. G. Redfield, Adv. Magn. Res. 1965, 1, 1
- /179/ D. H. Williams, I. Fleming, "Spektroskopische Methoden
zur Strukturaufklärung" Thieme Verlag, Stuttgart 1975, 171
- /180/ P. D. Sullivan, J. Am. Chem. Soc. 1968, 90, 3618
- /181/ G. Schlömp, Dissertation FU Berlin 1983
- /182/ B. Kirste, H. Kurreck, J. Am. Chem. Soc. 1980, 102, 6180
- /183/ M. von Glehn, B. Stensland, P. Kierkegaard, in "Flavins
and Flavoproteins", eds. K. Yagi, T. Yamano, Japan Scient.
Soc. Press 1980, 37
- /184/ G. E. Pake, T. R. Tuttle, Phys. Review Lett. 1959, 3, 3612
- /185/ D. S. Leniart, J. S. Hyde, J. C. Vedrine, J. Phys. Chem.
1972, 76, 2079
- /186/ D. E. Edmondson, in "Biological Magnetic Resonance Vol. 1",
eds. L. J. Berliner, J. Reuben, Plenum Press, New York
1978, 205
- /187/ W. Lubitz, R. Biehl, K. Möbius, J. Magn. Res. 1977, 27, 411
- /188/ M. Szwarc ed. "Ions and Ion Pairs in Organic Reactions",
Vol. 2, Wiley Interscience, New York 1974
- /189/ B. Kirste, Chem. Phys. Lett. 1981, 83, 465
- /190/ W. H. Walker, P. Hemmerich, V. Massey, Helv. Chim. Acta
1967, 50, 2269
- /191/ W. H. Walker, P. Hemmerich, V. Massey, Eur. J. Biochem.
1970, 13, 258

- /192/ A. J. W. G. Visser, N. H. G. Penners, F. Müller, in "Dynamic Aspects of Protein-Protein Association Revealed by Anisotropy Decay Measurements" W. de Gruyter, Berlin 1983, 137
- /193/ E. Knight jr. R. W. F. Hardy, J. Biol. Chem. 1967, 242, 1370
- /194/ a) V. Massey, F. Müller, R. Feldberg, M. Schumann, P. A. Sullivan, L. G. Howell, S. G. Mayhew, R. H. Matthews, J. Biol. Chem. 1969, 244, 3999
b) T. Mincey, G. Tayrien, A. S. Mildvan, R. H. Abeles, Proc. N. A. S. USA 1980, 77, 7099
- /195/ K. Shiga, G. Tollin, in "Flavins and Flavoproteins", ed. T. P. Singer, Elsevier, Amsterdam 1976, 422
- /196/ V. Massey, S. Ghisla, K. Kieschke, J. Biol. Chem. 1980, 255, 2796
- /197/ N. Bretz, Diplomarbeit FU Berlin 1982; beabsichtigte Dissertation FU Berlin
- /198/ W. Kieslich, Diplomarbeit FU Berlin 1977
- /199/ W. Kaim, Angew. Chem. 1983, 95, 201
- /200/ S. G. Mayhew, V. Massey, Biochim. Biophys. Acta 1973, 315, 181
- /201/ J. Geissler, Dissertation Universität Konstanz, 1983
- /202/ P. Hemmerich, S. Fallab, H. Erlenmeyer, Helv. Chim. Acta 1956, 39, 1242
- /203/ R. W. Grauert, Liebigs Ann. Chem. 1979, 1802
- /204/ A. H. Blatt, ed., "Organic Synthesis II", John Wiley and Sons, New York 1966, 60
- /205/ G. Nübel, W. Pfeleiderer, Ber. 1961, 95,
- /206/ F. Beilstein, A. Kuhlberg, Ann. Chem. 1870, 156, 66
- /207/ E. Wedekind, E. Bruch, Ann. Chem. 1929, 471, 73
- /208/ H. L. Haller, E. Q. Adams, J. Am. Chem. Soc. 1920, 42, 1841
- /209/ O. Doebner, Ber. Chem. Ges. 1978, 11, 2275

/210/ A. L. Thomsen, Ber. Chem. Ges. 1877, 10, 1583

/211/ J. von Braun, Ber. Chem. Ges. 1908, 41, 2100

Diese Arbeit wurde im Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. H. Kurreck angefertigt.

Mein Dank gilt

Herrn Professor Dr. H. Kurreck für die Überlassung des Themas sowie für sein stetes Interesse an dieser Arbeit und die vielen anregenden Diskussionen,

Herrn Dr. B. Kirste und Herrn Dr. W. Lubitz für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und Lösung anstehender theoretischer und praktischer Probleme,

Frau J. Geissler und den Herren Bretz, Elsner, Grauert, Kraus, Kroneck und Müller für die Überlassung diverser Substanzen und Enzymproben,

Herrn Dr. W. Kieslich für die Überlassung eines Simulationsprogrammes,

Frau E. Weilbacher und Herrn Prof. Dr. Allendoerfer für die elektrochemische Darstellung der Anionradikale,

Frau B. Ostwald und Herrn Dr. G. Holzmann für die Aufnahme und Hilfe bei der Interpretation der Massenspektren,

meinen Laborkollegen H. H. David, M. Elsner und U. Wanja für die gute Zusammenarbeit,

sowie allen nicht genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe, die durch Schaffung eines ausgezeichneten Arbeitsklimas und ihre Diskussionsbereitschaft ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

25. 4. 1956 Geburt als Sohn des Konstrukteurs Otto Bock
 und seiner Ehefrau Ingeborg geb. Seydel in
 Berlin
- 1962-1968 Grundschule in Berlin
- 1968-1974 Lessing-Gymnasium in Berlin
- 1974 Reifeprüfung
- 1975 Immatrikulation an der Freien Universität
 Berlin mit Hauptfach Chemie
- 1977 Diplomvorprüfung
- 1980 Diplomhauptprüfung
- Diplomarbeit über "¹⁴N- und ¹H-ENDOR-Experimente
 an paramagnetischen Modellverbindungen des
 Flavinsystems" unter der Anleitung von Herrn
 Prof. Dr. H. Kurreck
- 1980 Beginn der Arbeit an der vorliegenden Disser-
 tation in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof.
 Dr. H. Kurreck

Bisherige Tätigkeiten

- 1979-1980 Tutor im Chemiepraktikum für Mediziner
- 1980-1981 Teilzeitassistent im Chemiepraktikum für
 Mediziner
- 1981-1982 Teilzeitassistent im organisch-chemischen
 Grundpraktikum für Chemiker
- 1982- Wissenschaftlicher Assistent im organisch-
 chemischen Grundpraktikum für Chemiker

